



**HAL**  
open science

# Caractérisation de facteurs bactériens essentiels à la virulence des souches de *Escherichia coli* associées à la maladie de Crohn

Benoit Chassaing

► **To cite this version:**

Benoit Chassaing. Caractérisation de facteurs bactériens essentiels à la virulence des souches de *Escherichia coli* associées à la maladie de Crohn. Sciences agricoles. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2011. Français. NNT : 2011CLF1MM25 . tel-00855515

**HAL Id: tel-00855515**

**<https://theses.hal.science/tel-00855515>**

Submitted on 29 Aug 2013

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

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

UNIVERSITE D'Auvergne  
N° d'ordre :

UNIVERSITE BLAISE PASCAL  
Année 2011

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

## *Thèse*

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

soutenue le 09 Décembre 2011  
par

**Benoit CHASSAING**

## **CARACTERISATION DE FACTEURS BACTERIENS ESSENTIELS A LA VIRULENCE DE SOUCHES DE *ESCHERICHIA COLI* ASSOCIEES A LA MALADIE DE CROHN**

### **JURY**

**Rapporteurs :** CASCALES Eric, Chargé de recherche, CNRS-UPR9027, Marseille  
MERESSE Stéphane, Directeur de Recherche, CNRS UMR 6102, INSERM U631, Marseille.

**Examineurs :** BOMMELAER Gilles, Professeur, CHU Estaing, Clermont-Ferrand  
CARBONNEL Franck, Professeur, APHP, Paris  
PEYRET Pierre, Professeur, Clermont-Ferrand I

**Directeur de thèse :** DARFEUILLE-MICHAUD Arlette, Professeur, Clermont-Ferrand I







UNIVERSITE D'Auvergne  
N° d'ordre :

UNIVERSITE BLAISE PASCAL  
Année 2011

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

## *Thèse*

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

soutenue le 09 Décembre 2011  
par

**Benoit CHASSAING**

# **CARACTERISATION DE FACTEURS BACTERIENS ESSENTIELS A LA VIRULENCE DE SOUCHES DE *ESCHERICHIA COLI* ASSOCIEES A LA MALADIE DE CROHN**

## **JURY**

**Rapporteurs :** CASCALES Eric, Chargé de recherche, CNRS-UPR9027, Marseille  
MERESSE Stéphane, Directeur de Recherche, CNRS UMR 6102, INSERM U631, Marseille.

**Examineurs :** BOMMELAER Gilles, Professeur, CHU Estaing, Clermont-Ferrand  
CARBONNEL Franck, Professeur, APHP, Paris  
PEYRET Pierre, Professeur, Clermont-Ferrand I

**Directeur de thèse :** DARFEUILLE-MICHAUD Arlette, Professeur, Clermont-Ferrand I



*A mes grands-parents*

*A princesse*





## Remerciements

Je remercie très sincèrement Monsieur le Docteur **Eric Cascales** et Monsieur le Docteur **Stéphane Meresse** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et d'avoir consacré du temps à la lecture, l'analyse et la critique de ce mémoire. Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Franck Carbonnel** et Monsieur le Professeur **Gilles Bommelaer** d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse. Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur **Pierre Peyret** de me faire l'honneur de présider ce jury.

Je tiens à remercier particulièrement ma directrice de thèse, Madame **Arlette Darfeuille-Michaud**. **Arlette**, comment te remercier... Je me souviens de notre rencontre à l'IUT, ou, grâce à toi, j'ai tout de suite senti qu'une histoire allait naître entre la biologie moléculaire et moi. Tu m'as ouvert les portes de ton laboratoire pour un stage qui ne devait durer que 10 semaines, il y a 6 ans déjà... Je ne pourrais jamais assez te remercier pour la confiance que tu m'as accordée. Tu m'as appris tant de choses. Ton optimisme tout d'abord, parfois difficile à suivre, tes idées qui ont sans cesse fait avancer nos projets, ton amour pour l'enseignement qui, j'en suis sûr, est contagieux. Merci d'avoir contribué à cette thèse, et de t'y être autant investie. Merci également pour tous les à-côtés. Je pense notamment à nos discussions pas toujours scientifiques derrière ton ordi ou à nos courses « gastronomiques » à Capri avant notre retour à l'hôtel \*\*\*\*\*. Que de bons moments ! Merci également pour ton hospitalité et celle de J.E. chemin du Moulin du Péché, où les barbecues, les tapas, et les immenses tablées resteront de très bons souvenirs festifs !

Merci à tous les membres de l'équipe, **Valérie, Anne-Lise, Richard, Laurent, Nicolas B., Elisabeth, Mathilde, Marie-Agnès, Guillaume, Adeline, Pierre S., Amélie, Emilie, Nicolas D., Marga, Hang, Emmanuel, Jérémy, Lucie, Jenny, Pierre L., Sylvie, David, Carine, Christine, Marie-Pierre**. Quel plaisir de vous avoir côtoyé durant ces quelques années, d'avoir pu partager du temps avec vous tous, et de toujours pouvoir compter sur vous dans les bons ou les mauvais moments. Merci à vous tous.

**Anne-Lise**, merci de tout cœur pour tes encouragements, ton soutien, et pour ta vision si juste sur tant de choses. J'ai tellement d'admiration pour ta force et ton courage, et j'ai beaucoup appris à tes côtés durant toutes tes épreuves. Tu as toujours été à l'écoute de nos petits soucis, même dans les moments les plus difficiles pour toi. Comme dirait l'autre : « depuis que t'es montée là-haut, les anges n'ont jamais été si beaux ». Tu nous manque tant. Tu me manques tant.

Un grand merci à **Valérie** (tu as vu, je ne t'ai pas appelé Valoche...ah ben si en fait) pour ton soutien et ton réconfort sans faille à tout moment du jour (et de la nuit aussi). Tu es toujours là pour écouter



*nos petits soucis, nos cris de joie lors de la réussite d'une manip, ou nos voix si douces chantant du Céline Dion. Merci, ça ne doit pas être facile...*

***Richard**, merci pour ton aide si précieuse lors de ces années. Je me souviens de nos analyses bioinformatiques communes, ou je faisais vraiment tout pour essayer de te suivre, et je pense y être arrivé. Merci pour toutes ces données qui ont permis de débiter ce travail.*

*Merci à tous les habitants du bureau MCU-CR (et chirurgien).*

***Marie**, toi qui as suivi mes premiers pas dans le laboratoire il y a 6 ans déjà, merci beaucoup. Merci d'avoir eu la force, le courage, et surtout la patience de m'encadrer. Ah ce fameux mutant dsbA, il nous en aura fait voir, tient ! Félicitations pour cette nouvelle vie qui commence pour vous dans quelques semaines désormais...*

***Zabou**, merci pour ton sourire et ta bonne humeur quotidienne. Tu es un peu le Sheldon de l'immunologie, tu le sais ça ? (et moi Penny...). Un grand merci pour le temps passé à la relecture de mon manuscrit. J'espère qu'un jour, on confirmera l'existence des cellules dendritiques. Au fait, tu t'es déjà demandé si... non rien.*

*Un gros merci à **Nicolas B.** pour son aide durant ces nombreuses années. Notre première rencontre fut bien drôle, comme de nombreux moments passés par la suite. Merci pour toute l'aide lors de ces années, au labo ou à l'IUT. Barcelone et Roland Garros (en vrai ou grâce au vidéoprojecteur de la salle de réunion...) resteront de très beaux souvenirs de cette thèse, merci à toi.*

***Laurent**, merci pour ta gentillesse et pour nos pauses communes. J'espère te revoir vite !*

***Mathilde**, la petite dernière, merci pour tout les moments que l'on a partagé, de notre premier TP commun à l'IUT jusqu'au dernier café que l'on boira ensemble. Merci également pour la pièce (cave) que tu vas me louer dans ta jolie maison, tu en seras la gardienne. Fais une bise à Arnaud Lemaire bien sûr.*

*Merci à notre petit chirurgien **Manu**, pour nos belles et longues discussions, et pour les nombreux repas passés ensemble à critiquer celui de Pedro. Un gros merci pour notre repas commun au mariage de Nico et Assia, ce fût un moment très agréable. Merci également de m'avoir fait vivre ma première opération, j'ai appris tant de choses ce jour là...*



Un grand merci à nos 3i, (presque) toujours prévenants avec nous les thésards. Au fait, on ne sait toujours pas si le « i » de 3i veut dire incompetent ou incapable. **Amélie**, la plus grande fan de Céline Dion (après René bien sûr) et de Kate (après William et moi bien sûr). Que de fous rires nous avons eu ensemble, que de belles soirées et de beaux moments... Merci à toi. **Adeline**, la maman piou piou, merci à toi pour ton aide tout au long de ces années. Je me souviendrai longtemps de notre soirée aux Berthoms (même si toi, tu ne dois pas te souvenir de grand chose...). Je suis sûr que Maël fera un très bon chercheur. **Pedro**, merci pour les longues discussions que nous avons eu ensemble, même si je n'étais pas toujours consentant. Merci pour ton aide toujours très précieuse sur les commandes (par contre, mets-toi bien dans la tête qu'on ne s'intéresse pas forcément aux commerciaux concernés par notre produit...). Je te souhaite de garder la 206 encore de nombreuses années, car vu les frais que tu y as fait, ça serait dommage de ..... non non pas de centri s'il te plaît...

**Guillaume et Hang**, merci pour votre gentillesse, pour vos conseils et votre bonne humeur. Merci d'avoir pris le temps de parler de votre post doc et de votre expérience en général avec Emilie, c'est aussi grâce à vous si nous avons pris la décision de tenter l'expérience. Je comprends la déception de Didier de vous avoir vu partir, vous êtes scientifiquement et humainement de rares personnes.

**Sylvie**, mademoiselle type VI, mademoiselle Fis, et désormais miss Paris, merci pour les longs moments passés ensemble au labo, pour nos soirées manip, et pour nos longues discussions où nous étions, il est vrai, souvent d'accord. Tu es quelqu'un de bien, car quand on aime Saez, on ne peut qu'être quelqu'un de bien. Je me souviens avec joie de notre concert de Cali, ou tu bogottais comme une folle, ce fut un super moment. Je te souhaite pleins de bonheur pour le futur, tu le mérites. Et, juste pour toi, et parce que je l'ai écouté pour t'écrire ces quelques mots, « Ma Roberta a une robe, qui trébuche jusqu'aux chevilles, ..... ».

**Frédo**, ah!lala Frédo. Que dire, et surtout comment le dire. Que de moments passés ensemble, avant, pendant, et après ta thèse. Je me souviens encore de notre rencontre à l'IUT ou j'ai d'abord cru que tu étais un nouvel élève... Merci pour tout cela, merci d'avoir su me mettre sur la piste de ce post doc que je m'apprete à réaliser, je suis fier de prendre ta suite, et j'espère être à la hauteur. Merci aussi pour les innombrables questions auxquelles tu as su répondre, et pour mes craintes que tu as su calmer. Et bien sûr, merci pour nos belles et longues soirées.

Un grand merci à mon ancien voisin de paillasse, **Pierre**. Merci pour tous ces moments que nous avons passés ensemble au labo, mais aussi en dehors. Promis, j'apprendrai aux américains comment faire une bonne carbo-blaque. Je resterais toujours très frustré de ne pas être arrivé à te convertir au majestueux monde procaryote. Enfin bon, si tu arrives à trouver le monde eucaryote fabuleux, tant mieux pour toi... Je



suis fier de notre soirée du Téléthon, nous avons tellement donné ce jour là, et sans avoir à composer le 36-37. Merci aussi pour les quelques nuits que nous avons pu passer au bord de l'eau, dans un cadre magnifique et les cannes à l'eau, à attendre parfois très longtemps les biiiiip trop rares. Le chocolat blanc restera une valeur sûr, bien plus que le curly ou le maïs, crois moi...

**Emilie**, ma petite Emilie, merci de m'avoir supporté et d'avoir répondu aux innombrables questions du gros curieux que je suis. Je suis content d'avoir pris le temps de parler avec toi, car j'ai découvert quelqu'un de si gentil et prévenant. Je suis ravi que ce soit toi qui porte le projet LPF et immunité, ta détermination et ta rigueur seront des atouts de poids. Je me souviens du jour où tu m'as dit que j'étais « quelqu'un de bien ». J'ai été fier ce jour là, et je le suis encore. Merci.

Un gros merci à **Nico D.**, pour tous les moments que nous avons partagé au labo et en dehors, et à toute heure. Nous avons la même vision sur tellement de chose, c'est agréable. On a vraiment passé de supers moments à la Colombière à refaire le monde et à boire du cidre avec Lulu. Je me souviendrais encore longtemps de ces moments. Un mariage parfait, et un bébé qui le sera tout autant, bravo à vous. Un gros merci à **Assia** également, pour ta gentillesse et tes talents culinaires. Nous étions tellement fiers et heureux de venir rompre le jeûne avec vous !

**Marga**, tu manques déjà tellement au labo. Narcisse a tant de chance d'avoir ton sourire (et tes tapas) au quotidien. Notre explication sur la prononciation du mot « igloo » reste un super moment de notre amitié. Je te souhaite plein de belles choses à Girona.

Un énorme merci aux personnes qui nous supportent et nous aident au quotidien, et qu'on oublie bien trop souvent de remercier. Merci à **Marie-Pierre, Christine, Carine** et **David**, votre aide m'a été tellement précieuse. **Marie-Pierre**, merci pour les tasses ;-)

Un grand merci également à nos **voisins**, toujours partant pour donner un coup de main, un produit, un conseil ou un sourire. Ce fut très agréable de vous côtoyer durant ces quelques années.

Je souhaite également remercier toutes les personnes avec lesquelles nous avons eu la chance de collaborer : Pr. **Johann Soderholm** et Dr. **Sa'ad Salim** (Linköping, Suède) pour les manip sur plaques de Peyer humaines, Pr. **Barry Campbell** et Dr. **Maelle Prorok-Hamon** (Liverpool, Royaume Unis) pour les manip cellules M. Mes semaines en Suède (au mois de février ...) et à Liverpool (au mois d'octobre ...) furent très enrichissantes, pluvieuses et... enneigées. De superbes rencontres, merci.





*Un grand merci aux filles du CICS, **Christelle Blavignac**, **Claire Szczepaniak** et **Lorraine Gameiro** (CICS) pour leur assistance technique, pour la microscopie électronique, et pour tout le reste. **Christelle**, merci pour ton aide inconditionnelle, pour tes conseils, pour nos longues discussions derrière le MET, et pour ton amitié.*

*Un grand merci également à tous les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer, **Coralie**, **Alexis** et **Anthony**. Vous avez été de très bons jeunes padawans, je suis fier de vous. **Coralie**, tu as été ma première victime, et tu me laisses un souvenir si agréable. Tu vas faire une superbe thèse désormais, avec tes capacités et ton labo d'accueil, il ne peut t'arriver que cela. Je garde précieusement le Bourgueil, et j'espère qu'on le boira un jour ensemble. **Alexis**, j'espère que les dix semaines passées en ma compagnie t'ont donné envie de continuer. Je garde également le vin que tu m'as offert, il faut qu'on le boive ensemble. Enfin un grand merci à **Anthony** pour les quelques semaines que nous avons passés ensemble à sacrifier de la louloute. Je profite de ces quelques lignes pour te dire que, si toi aussi tu te décides à m'offrir une bonne bouteille, on pourra la boire ensemble. A moins qu'elle passe elle aussi à la machine à laver...*

*Je voudrais aussi remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer à l'I.U.T., les enseignants et les techniciennes. Merci à **Catherine** pour les innombrables services rendus, et pour ta gentillesse. Merci également à tous les étudiants que j'ai eut la chance d'avoir en face de moi, pas toujours réveillés, très souvent inquiets de savoir l'heure à laquelle on allait manger, mais toujours tellement agréables... Merci à **Delphine** et **Micka** pour ces derniers TP de microbiologie, très agréables. Un gros merci à **Joséphine** pour notre superbe discussion d'après TP. Une pensée toute particulière à **Romain**.*

*Je voudrais ensuite remercier mes amis, eux que j'ai choisis et qui me sont si chers.*

*Un immense merci à **Nathalie**, grâce à qui les histoires RpoE et LPF ont vu le jour. Mais bien au delà de ça, c'est l'amie de chaque instant que je souhaiterais remercier. **Nath**, tu as toujours été présente, tu m'as tellement soutenue, tu m'as appris énormément au labo, mais aussi sur la vie. Tu es une leçon d'amitié. Sans toi, tout cela aurait été différent. Des souvenirs de notre complicité, il y en a des dizaines, tous aussi importants pour moi les uns que les autres. Je ne citerais que le premier, une soirée il y a 7 ans, ou nous avons parlé de l'idée qu'un jour, peut être, je ferais une thèse comme toi... On ne se doutait pas de la suite... Je suis fier d'être ton ami, toi qui m'as si souvent soutenue. J'espère avoir été à la hauteur en ayant élu domicile à ta paillasse. Merci pour tout **Nath**.*



*Jérémy, mon voisin de paillasse et collègue de galère avec qui j'ai également eut la chance de partager de nombreux moments hors du labo. Merci à toi pour tous ces superbes moments, pour tes réveils difficiles à Barcelone et à Paris, pour toutes nos pauses communes, et pour le temps passé ensemble à l'IUT.*

*Jenny, ma nouvelle voisine de paillasse, tu as toujours été présente pour écouter mes craintes et inquiétudes, et qu'est ce que tu as pu me faire rire. Ce fut si doux et agréable de te côtoyer durant tout ce temps, au labo et en dehors. Je profite de ce petit mot pour te conseiller de ne plus jamais boire de Beaujolais nouveau, je pense que tu le digères mal. Bon courage pour la suite de ton aventure, mais la détermination ne te manque pas.*

*Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements à **Lucie**, avec qui j'ai eut la chance de partager beaucoup de temps durant ces derniers mois. Lulu, tu es et tu resteras une de mes plus belles rencontres de ces années. J'ai eut tellement de chance d'avoir eu à travailler avec toi et de passer ces nombreuses heures en ta compagnie au labo. Tu es une vraie gentille, pleine de qualités. Il est vrai que tu as bien quelques défauts, mais ils ne servent que de faire valoir à tes innombrables qualités. Tu as pris le temps d'apprendre à me connaître, tu as toujours été là pour moi en toute circonstance. J'espère rester longtemps ton « docteur Mamour » et ton « papa LPF ». Je te souhaite le meilleur pour la suite de ton aventure et même après mon départ, je serai toujours présent pour répondre à tes nombreuses interrogations. Lucie, merci pour ton amitié, ton réconfort et notre complicité (si tu pleures à la lecture de ce paragraphe, il s'autodétruit dans 5 secondes...).*

***Eric**, tant de choses ont commencé avec toi. Le lycée tout d'abord, puis l'IUT, puis le Master, puis la thèse. Mais où va-t-on s'arrêter ? Que de moments de complicité passés ensemble, des souvenirs à la pelle, et ton soutien toujours sans faille. Merci pour tous ces moments, en amphî, en soirée ou à Bourg-Lastic. Le tour du lac Pavin une nuit de décembre sans lumière mais avec le chauffage reste un souvenir unique. J'espère que tu ne m'en veux pas de t'avoir poussé à faire une thèse... Une grosse pensée à **Elodie** qui a été très présente dans ces derniers moments et toujours partante pour nous soutenir de toutes les manières. Merci à vous deux, et vive Craig Venter !*

*Un gros merci à **poulet** et **poulette** pour toutes les soirées et virées que l'on a put partager. Je vous souhaite à tous les deux le meilleur pour la suite, dans vos vies professionnelles et bien entendu dans vos vies privées. GadE n'a qu'à bien se tenir !*



Une pensée pour **Elodie, Sandra, Sylvain, Pascal et Julie** avec qui j'ai passé de supers moments, studieux ou non. On était bien en M2 quand même... Merci **Sandra** de nous avoir fait tant rire, bien malgré toi... **Elodie**, bon courage pour ta vie parisienne. J'ai passé de superbes moments avec vous tous, merci.

Je souhaite également remercier ceux avec qui j'ai eut la chance de partager de supers moments durant mes études, notamment **Alexandre et Christelle** que je n'oublierais jamais. **Alex**, que de bons moments avec toi en TP de microbiologie, un superbe voyage à Argeles, et un mariage magnifique, merci pour tout. Cricri, on ne compte plus le nombre d'heure de discussion que nous avons partagé, mais je crois qu'on a du retard à rattraper...

Un grand merci à **Mylène et Jérémie**, pour les supers moments que j'ai eut la chance de partager avec vous. J'espère être digne de la « you touch my tralala company ». **Mylène**, j'ai passé de supers moments avec toi pour la préparation de la thèse de Dügster, alors que la mienne approchait à grand pas. Merci.

**Céline**, on ne s'est pas beaucoup vu durant ces dernières années, et tant de choses ont changé. Tu as toujours été fier de moi, et tu m'as toujours poussé vers l'avant, c'est si agréable. J'ai beaucoup de chance de te compter dans mon cercle, merci.

Un merci tout particulier à **Jean-Claude, Isabelle, Dominique, Eric, Patrice, Sébastien, Ludovic, Frédo, Elie, Antoine, Yves, Pierre** et les autres de la section tennis de l'**Amicale Laïque d'Aubière**. Vous avez été mon sas de décompression lors de ces trois années. Que de bons moments passés ensemble, sur les courts, en compétition, à la coupe Davis, ou au cabanon.

**Pépé**, merci pour tous tes petits conseils et pour nos longues discussions sur la vie et ton expérience si riche. Cela m'a tellement apporté de te côtoyer durant ces dernières années. Tu as un peu été mon papy par procuration, merci pour cela. Merci également pour ton Génépi, d'une qualité remarquable... Je suis fier d'être le seul homme à te faire la bise.

**Mémé et gros loup**, merci de m'avoir introduit à l'amicale et à la compétition. Nos entraînements du vendredi étaient géniaux. Merci à vous de m'avoir amené à Lyon pour la Jean Macé, puis à Colmar. Comme tu le dis si bien **Mémé**, on a fabriqué de bons souvenirs durant ces deux week-end. **Gros loup**, tu resteras mon référent pour le saucissonnage. Merci pour votre soutien dans les bons et les mauvais moments, dans les victoires et dans les défaites.



Mon **Peter**, aussi connu sous le nom de **Martina Hingis**, merci pour les bons moments passés ensemble au club, ou en dehors. Ton travail te prend tellement de temps, tu n'en as pas beaucoup de libre, mais tu n'hésites jamais à nous le faire partager. Si un jour j'ai la chance de revenir par ici, j'espère que Suawa m'acceptera et que l'on se mettra au golf ensemble.

Un grand merci à **Pat**, **Babine** et **Elie**, pour les bons moments passés à l'entraînement, et pour les superbes matchs par équipe FFT de l'été dernier. C'est qui les champions ? Je suis fier d'être votre ami.

**Dominique**, grâce à toi cette thèse est dédiée à une princesse et non pas à un prince. Merci pour cela, et merci pour tout le reste.

Un grand merci à toute la troupe de l'Oxoxo avec qui j'ai pu partager des soirées que l'on ne peut pas oublier (quoi que) et qui m'ont permis de lâcher un peu la pression lorsque c'était nécessaire. Merci à **Cédric** et à ses sauts d'humeurs théâtrales (tu veux ma veste en cuir ?), merci à **Leslie** pour l'accueil que tu as toujours su nous réserver, merci à **Louis** pour ton hospitalité, et surtout celle du dimanche soir, merci à **Couz** pour les moments que l'on a partagés, pour ta blague du citron pressé que j'ai du entendre une bonne cinquantaine de fois et pour l'igaunuration (non non je n'ai pas fait de faute de frappe...), et merci à tous les autres.

Enfin, je voudrais remercier ma famille, toujours présente et réconfortante...

**Maman**, **Papa**, l'ensemble de ce travail n'aurait jamais pu voir le jour sans le soutien inconditionnel que vous m'avez apporté durant ces longues et nombreuses années. Je vous dois beaucoup, votre amour immense et votre présence à mes côtés durant toutes les étapes de ce périple. Je ne pourrais jamais assez vous témoigner l'amour et l'admiration que je vous porte. Vous avez fondé une si belle famille, et vous serez des grands parents d'enfer. C'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui. Merci

Une grosse pensée pour mes **grands parents**, partis trop tôt pour avoir vu mon parcours et celui de tous mes cousins/cousines. Vous auriez été, je pense, tellement fier de nous.

Merci à mon **frère** d'avoir toujours été là pour moi, depuis tant d'années. Merci **Karine** pour ta gentillesse et pour les soirées à Saint-Clément où l'accueil a toujours été chaleureux. Et merci infiniment à





*vous deux de me faire l'honneur d'être tonton, et parrain. Vous ne pouvez pas savoir à quel point cette nouvelle a égayée ma fin de thèse et l'a remplie de bonheur.*

*Un gros merci à mon tonton **Marc**, que j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés durant ces longues années. Tu as toujours été présent, pour m'écouter et me conseiller (c'est ton métier cela dit), sauf lorsque tu étais en vacances. Merci à toi, tu es si gentil et attentionné à mon égard, j'ai beaucoup de chance.*

*Un immense merci à mon cousin le **Belou** avec qui j'ai eu la chance de passer de superbes moments loin du labo, et souvent au bord de l'eau. Ces moments m'ont permis de prendre tellement de recul, je ne pourrais jamais assez te remercier. Tu es vraiment un super couz'.*

*Merci à ma deuxième famille, celle d'Emilie, avec qui les week-ends passés ensemble nous ont permis de nous changer les idées quand cela devenait nécessaire. Merci à **Nadine, Jean-Luc et Loïc** avec qui nous avons eu la chance de pouvoir décompresser lors de supers moments en famille, qui resteront des souvenirs très importants pour moi. Merci aux petits cousins et petites cousines pour les parties de ping pong, merci aux grands parents pour ces supers moments passés. **Fanny Petioooooot**, merci beaucoup pour tes visites clermontoises qui nous ont fait tant plaisir.*

*Enfin, un immense merci à celle qui aura été là pour moi dès le début et jusqu'à la fin de cette aventure, qui m'a toujours soutenu, conseillé, et aimé plus que je ne le mérite. **Emilie**, je ne saurais jamais comment te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu as été mon soutien inconditionnel dans toute les situations, mon réconfort, mon épaule. Tu as su me comprendre et m'écouter lorsque j'en avais besoin. Tu es un des plus beaux cadeaux qui me soit arrivé, et je suis tout simplement heureux de continuer cette aventure dans un labo différent, une ville différente, un pays différent, loin de beaucoup de gens qui nous sont chers, mais avec toi. Sans toi, tout aurait été moins doux et agréable.*

*Merci à tous*



## Sommaire

Résumé	1
Index des illustrations	2
Abréviations	6
Introduction	8

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I- Le système digestif</b>	<b>10</b>
I-1- Physiologie générale du système digestif	10
I-2- Fonctions de l'épithélium digestif	10
I-3- Organisation et fonction de la barrière épithéliale intestinale	11
I-3-1- Le mucus	12
I-3-2- Les peptides antimicrobiens et les IgA	13
I-3-3- Les jonctions intercellulaires et la perméabilité intestinale	13
I-3-4- Le tissu lymphoïde associé à l'intestin	14
I-3-4-1- Généralités	14
I-3-4-2- Les plaques de Peyer	15
I-3-4-2-1- Ontogenèse des plaques de Peyer	16
I-3-4-2-2- Description des plaques de Peyer	16
I-3-4-2-3- Fonction des plaques de Peyer	17
I-3-4-2-4- Migration des lymphocytes T et des plasmocytes à IgA dans la muqueuse intestinale	17
I-3-4-2-5- Les plaques de Peyer : une porte d'entrée pour des bactéries pathogènes	18
I-3-4-2-6- Ciblage des plaques de Peyer et intérêts thérapeutiques	19
I-4- La flore microbienne intestinale	19
<b>II- La maladie de Crohn</b>	<b>22</b>
II-1- Généralités	22
II-1-1- Epidémiologie : prévalence et incidence	22



II-1-2- Manifestations cliniques	23
II-1-3- Diagnostic clinique	23
II-1-4- Les marqueurs biologiques	25
II-1-4-1 Les anticorps dirigés contre des résidus sucrés	25
II-1-4-2 Les anticorps dirigés contre un épitope bactérien	26
II-1-5- Stratégies thérapeutiques	27
II-2- Facteurs étiologiques de la maladie de Crohn	29
II-2-1- Facteurs environnementaux	29
II-2-2- Facteurs immunitaires	31
II-2-3- Facteurs génétiques	32
II-2-3-1- <i>NOD2/CARD15</i>	33
II-2-3-2- PepT1	36
II-2-3-3- Gènes de l'autophagie	36
II-2-3-4- IL23-R	39
II-2-3-5- Toll-Like Receptor	40
II-2-4- Autres facteurs de l'hôte	41
II-2-4-1- Stress du réticulum endoplasmique	41
II-2-4-2- Le récepteur CEACAM6	42
II-2-4-3- Les microARN régulateurs	43
II-2-5- Rôle du microbiote intestinal et facteurs infectieux	44
II-2-5-1- Translocation bactérienne excessive	46
II-2-5-2- La dysbiose	46
II-2-5-3- Implication d'un agent infectieux	48
<b>III- Microorganismes et maladie de Crohn</b>	<b>48</b>
III-1- Implication d'un agent viral	48
III-2- Implication de <i>Candida albicans</i>	50
III-3- Implication d'une bactérie pathogène	51
III-3-1- <i>Helicobacter</i>	51
III-3-2- Les bactéries psychotropes : <i>Yersinia</i> et <i>Listeria</i>	52
III-3-3- <i>Mycobacterium avium</i> subspecies paratuberculosis	53
III-3-4- <i>Escherichia coli</i>	55
III-3-4-1- Propriétés d'adhésion des souches de <i>Escherichia coli</i> associées à la maladie de Crohn	55



III-3-4-2- Propriétés d'invasion des souches de <i>Escherichia coli</i> associées à la maladie de Crohn	56
III-3-4-3- Survie et multiplication en cellules épithéliales	57
III-3-4-4- Survie et multiplication des souches de <i>Escherichia coli</i> associées à la maladie de Crohn en macrophages	58
III-3-4-5- Souches de <i>Escherichia coli</i> associées à la maladie de Crohn et formation de granulomes	59
III-3-4-6- Définition du pathovar AIEC et prévalence	60
III-3-4-7- Facteurs de virulence des AIEC impliqués dans la colonisation de la muqueuse intestinale et l'invasion des cellules épithéliales intestinales	62
III-3-4-7-1- Les pili de type 1	62
III-3-4-7-2- Les flagelles	63
III-3-4-7-3- Les vésicules de membrane externe	64
III-3-4-7-4 Système d'osmorégulation EnvZ/OmpR et activation de la voie $\sigma^E$	65





# TRAVAUX PERSONNELS

Présentation des résultats	68
<b>I- Implication de la voie de signalisation <math>\sigma^E</math> dans la capacité des souches AIEC à former des biofilms</b>	<b>69</b>
Introduction de la publication n°1	70
Publication n°1	71
Commentaires de la publication n°1	114
<b>II- Implication des Long Polar Fimbriae dans le ciblage des plaques de Peyer par les souches AIEC</b>	<b>120</b>
Introduction de la publication n°2	121
Publication n°2	122
Commentaires de la publication n°2	139
<b>Résultats complémentaires</b>	<b>145</b>
<b>Discussion – Perspectives</b>	<b>148</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>160</b>
<b>Annexes</b>	<b>194</b>
<u>Annexe n°1</u> : The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases	194
<u>Annexe n°2</u> : Interaction entre <i>Escherichia coli</i> et plaques de Peyer dans la maladie de Crohn : le rôle des long polar fimbriae	207
<u>Annexe n°3</u> : Interactions with M cells and macrophages as key steps in the pathogenesis of enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> infections	210



## Résumé

La maladie de Crohn (MC) est une affection inflammatoire chronique du tube digestif dont l'étiologie est multifactorielle. Les lésions iléales des patients atteints de MC sont anormalement colonisées par des souches pathogènes de *Escherichia coli* appartenant au pathovar AIEC pour « *Adherent-Invasive E. coli* ». Ces souches sont capables d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales, et ont la capacité de survivre et de se multiplier fortement en macrophages en induisant une synthèse intense de TNF- $\alpha$ . L'objectif de ce travail s'inscrit dans la compréhension des mécanismes permettant aux bactéries AIEC de coloniser la muqueuse intestinale et d'induire les stades précoces de la pathologie.

Une précédente étude menée au laboratoire avait permis de mettre en évidence l'importance de l'activation de la voie de régulation dépendante du facteur bactérien sigma alternatif RpoE (ou  $\sigma^E$ ) dans le processus d'adhésion et d'invasion des cellules épithéliales intestinales par la souche AIEC de référence LF82 via l'expression des pili de type 1 et des flagelles. En continuité de ces travaux, nous montrons que l'activation de la voie de signalisation dépendante du facteur  $\sigma^E$  est également primordiale pour la capacité des souches AIEC à former des biofilms, et une analyse bioinformatique ayant pour but d'identifier les gènes régulés par  $\sigma^E$  a montré que l'opéron *waaWVL*, impliqué dans la biosynthèse du lipopolysaccharide, est primordial pour la formation de biofilm par les souches AIEC.

De plus, nous avons mis en évidence que les *long polar fimbriae* (LPF) sont impliqués dans le ciblage de l'épithélium associé aux plaques de Peyer par les bactéries AIEC, et ceci en leur permettant de cibler spécifiquement les cellules M. L'inactivation du gène *Nod2*, gène de susceptibilité à la MC, conduit à une augmentation du nombre de plaques de Peyer ainsi que des cellules M à leur surface, indiquant que les bactéries AIEC pourraient tirer avantage d'une susceptibilité génétique pour cibler les plaques de Peyer.



## Index des illustrations

### Liste des figures :

**Figure 1 :** Etiologie multifactorielle de la maladie de Crohn.

**Figure 2 :** Organisation générale du système digestif humain.

**Figure 3 :** Mécanismes de défense mis en place au niveau de la barrière intestinale pour limiter les interactions entre les bactéries de la lumière et les cellules épithéliales intestinales.

**Figure 4 :** Organisation des jonctions intercellulaires au niveau de l'épithélium intestinal.

**Figure 5 :** Organisation du système immunitaire intestinale.

**Figure 6 :** Représentation schématique d'une plaque de Peyer.

**Figure 7 :** Observation par microscopie électronique de l'épithélium associé aux plaques de Peyer.

**Figure 8 :** Rôle immunitaire joué par les plaques de Peyer.

**Figure 9 :** Composition des communautés microbiennes associées au corps humain.

**Figure 10 :** Composition et concentration des espèces microbiennes dominantes dans les différentes régions du tractus gastro-intestinal.

**Figure 11 :** Première page de l'article écrit en 1932 par Crohn et collaborateurs décrivant la maladie de Crohn.

**Figure 12 :** Incidence et répartition de la maladie de Crohn dans le monde et en France.

**Figure 13 :** Principales différences entre la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique.

**Figure 14 :** Ulcérations aphtoides précoces à la surface des plaques de Peyer observées lors des stades précoces de la maladie de Crohn.

**Figure 15 :** Prévalence des anticorps dirigés contre des résidus glycosylés chez les patients atteints de maladie de Crohn, de rectocolite hémorragique, ou chez les patients contrôles.

**Figure 16 :** Etiologie multifactorielle de la maladie de Crohn.

**Figure 17 :** Différentiation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et profil d'expression de cytokines.

**Figure 18 :** Facteurs génétiques dans l'étiologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

**Figure 19 :** Structure du récepteur intra-cytoplasmique NOD2/CARD15.

**Figure 20 :** Fonction de NOD2/CARD15 dans l'activation de la voie NF-κB.

**Figure 21 :** Régulation négative de la voie TLR2 par la voie NOD2.

**Figure 22 :** Implication du transporteur PepT1 dans les MICI.



**Figure 23 :** Mécanisme moléculaire général de l'autophagie.

**Figure 24 :** Signalisation initiée par le récepteur IL-23R conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17.

**Figure 25 :** Activation des récepteurs TLR et réponses immunitaire innée.

**Figure 26 :** Implication du récepteur CEACAM6 dans la colonisation de la muqueuse iléale des patients atteints de MC.

**Figure 27 :** Biogenèse et maturation des microARN.

**Figure 28 :** Altération de l'expression de microARN dans le cadre de la rectocolite hémorragique et de la maladie de Crohn.

**Figure 29 :** Pourcentage de patients atteints de MC dépistés positifs pour la recherche d'anticorps dirigés contre 3 antigènes microbiens.

**Figure 30 :** Comparaison du microbiote intestinal chez des patients atteints de maladie de Crohn, de rectocolite hémorragique, et chez des sujets contrôles.

**Figure 31 :** Clichés de microscopie électronique à transmission de cellules épithéliales HEP-2 infectées par la souche de *E. coli* LF82.

**Figure 32 :** Autophagie et contrôle intracellulaire de la bactérie LF82.

**Figure 33 :** Clichés de microscopie électronique à transmission de macrophages J774-A1 infectés par la souche de *E. coli* LF82.

**Figure 34 :** Cliché de microscopie électronique à balayage d'une structure granulomateuse induite *in vitro* par la souche AIEC LF82.

**Figure 35 :** Les 6 classes de *E. coli* responsables de diarrhées.

**Figure 36 :** Les *E. coli* invasifs isolés de patients atteints de MC induisent une rupture de la barrière intestinale.

**Figure 37 :** Représentation circulaire du génome de la souche AIEC de référence LF82 et comparaison de la syntenie entre les plasmides pLF82, pHCM2 et pMT1.

**Figure 38 :** Structure de la sous-unité FimH, adhésine des pili de type 1.

**Figure 39 :** Vésicules de membrane externe.

**Figure 40 :** Implication du récepteur Gp96 dans le processus invasif des souches AIEC associées à la muqueuse iléale des patients atteints de MC.

**Figure 41 :** Schéma général du fonctionnement des systèmes de régulation à deux composants.

**Figure 42 :** Activation de la voie de signalisation  $\sigma^E$ .

**Figure 43 :** Modèle d'implication de la voie de signalisation impliquant le facteur  $\sigma^E$  dans la virulence de la souche AIEC LF82.





**Figure 44 :** Mesure de la formation de biofilms par des souches non-AIEC et des souches AIEC isolées de muqueuse iléale.

**Figure 45 :** Observation par microscopie électronique à transmission de la souche de *E. coli* ORN172 exprimant l'opéron *lpfABCDE* cloné de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

**Figure 46 :** Analyse de l'activation du promoteur de l'opéron *lpf*.

**Figure 47 :** Observation par microscopie électronique à transmission de l'expression de structures filamenteuses par la souche AIEC LF82, et par les mutants isogéniques LF82- $\Delta$ *fimA* et LF82- $\Delta$ *fimA*- $\Delta$ *lpfA* cultivés en présence ou en absence de sels biliaries.

**Figure 48 :** Analyse de l'interaction de la souche AIEC de référence LF82 sauvage et du mutant isogénique LF82- $\Delta$ *lpfA*, cultivés en présence ou en absence de 2% de sels biliaries, avec les plaques de Peyer murines, les plaques de Peyer humaines, et les cellules M.

**Figure 49 :** Effet de la présence de sels biliaries sur l'interaction des bactéries avec la muqueuse intestinale.

**Figure 50 :** Mesure de la translocation de la souche AIEC de référence LF82 à travers une monocouche de cellules M.

**Figure 51 :** Analyse de l'impact d'une culture des bactéries AIEC en présence de sels biliaries sur leur interaction avec les plaques de Peyer et l'expression de l'opéron *lpf*.

**Figure 52 :** Comparaison des séquences d'ADN précédant l'opéron *lpf* des souches LF43, LF47, LF57, LF63, LF73 et LF82.

### **Liste des tableaux :**

**Tableau 1 :** Principaux critères endoscopiques, anatomo-pathologiques et sérologiques distinguant rectocolite hémorragique et maladie de Crohn.

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

**Tableau 3 :** Stratégies et cibles pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

**Tableau 4 :** Modèles expérimentaux mettant en évidence le rôle du microbiote intestinal dans l'inflammation intestinal.

**Tableau 5 :** Arguments montrant l'implication du microbiote intestinal dans l'étiologie de la maladie de Crohn chez l'Homme.

**Tableau 6 :** Arguments pour ou contre l'implication de *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis dans la maladie de Crohn.



**Tableau 7 :** Etudes mettant en évidence l'augmentation de souches de *Escherichia coli* associées à la muqueuse de patients atteints de maladie de Crohn.

**Tableau 8 :** Prévalence des souches AIEC associées aux muqueuses iléale et colique de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et de sujets contrôles.

**Tableau 9 :** Tableau comparatif de la sous-unité majeure, de la chaperonne et de la protéine d'ancrage entre les pili de type 1 et les *long polar fimbriae*.



AIEC	<i>E. coli</i> adhérent-invasif
ANCA	<i>Deoxyribonuclease (DNase I)-sensitive perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody</i>
APEC	<i>E. coli</i> pathogène aviaire
ASCA	Anticorps anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CARD	<i>Caspase activating recruitment domain</i>
c-di-GMP	di-guanosine monophosphate cyclique
CEACAM6	<i>Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 6</i>
Cellule M	Cellule « <i>microfold</i> » ou « <i>membranous</i> »
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CRP	Protéine C réactive
DAEC	<i>E. coli</i> à adhésion diffuse
DLG5	<i>Disc large homolog 5</i>
DSS	Sulfate de dextran sodique
EAEC	<i>E. coli</i> entéroaggrégatif
EBV	Virus Epstein-Barr
EHEC	<i>E. coli</i> entérohémorragique
EIEC	<i>E. coli</i> entéroinvasif
EPEC	<i>E. coli</i> entéropathogène
ETEC	<i>E. coli</i> entérotoxinogène
ExPEC	<i>E. coli</i> pathogène extra-intestinal
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
GWA	<i>Genome-wide association</i>
H-NS	<i>Histone-like nucleoid structuring protein</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IRGM	<i>Immunity related GTPase M</i>
LEE	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
LPF	<i>Long polar fimbriae</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	<i>Leucine-rich-repeats</i>
MALT	<i>Mucosa-associated lymphoid tissue</i>



MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies Paratuberculosis
MBL	<i>Mannan binding lectin</i>
MC	Maladie de crohn
MDP	Muramyl dipeptide
ME	Membrane externe
MICI	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
miARN	micro-ARN
MNEC	<i>E. coli</i> responsables de méningites néonatales
NBD	<i>Nucleotide binding domain</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OCTN	<i>Organic cation carnitine transporter</i>
OMP	<i>Outer membrane protein</i>
OMV	<i>Outer membrane vesicle</i>
RCH	Rectocolite hémorragique
RE	Réticulum endoplasmique
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th	Lymphocyte T helper
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
T <sub>reg</sub>	Lymphocyte T régulateur
UPEC	<i>E. coli</i> uropathogène
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLP	<i>Virus-like particule</i>
WGA	<i>Wheat germ agglutinin</i>
ZO	<i>Zona occludens</i>



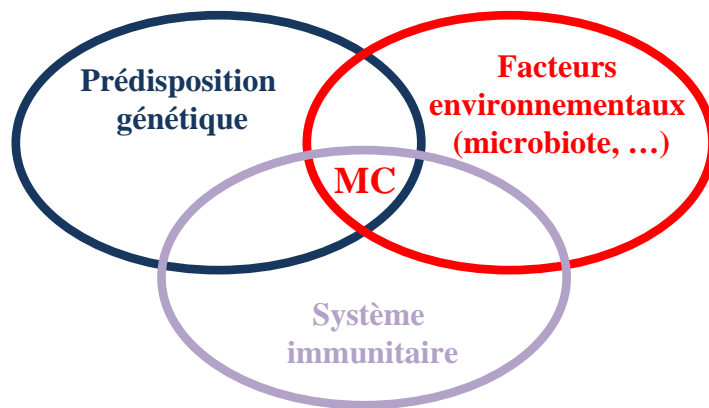


# *INTRODUCTION*









**Figure 1 : Etiologie multifactorielle de la maladie de Crohn (MC).** L'hypothèse étiologique la plus communément adoptée serait une réponse immunitaire anormale mettant en jeu le microbiote intestinal chez un malade génétiquement prédisposé.

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin caractérisée par un état d'hyperactivation du système immunitaire intestinal et évoluant par des poussées chroniques et des périodes de rémission. L'étiologie multifactorielle de cette maladie est encore mal connue et, de ce fait, aucun traitement spécifique n'est disponible. La MC touche avec prédilection l'adulte jeune et représente un problème majeur de santé publique de par ses conséquences invalidantes, sa nature chronique et récidivante, et sa prévalence croissante. Les données cliniques et expérimentales ont apporté la preuve d'une étiologie multifactorielle à composante génétique (**Figure 1**). Une des hypothèses étiologiques la plus communément adoptée est que la MC serait due à une réponse immunitaire anormale mettant en jeu le microbiote intestinal chez un malade génétiquement prédisposé.

Parmi les agents infectieux incriminés, plusieurs arguments épidémiologiques, cliniques et expérimentaux sont en faveur d'un rôle possible de *Escherichia coli* dans l'étiologie de la MC. Les *E. coli*, bacilles à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*, sont des bactéries commensales du tube digestif des mammifères et constituent l'espèce dominante de la flore aéro-anaérobie de l'intestin. Cependant, il existe des souches de *E. coli* pathogènes qui se distinguent des souches commensales par l'acquisition de propriétés de virulence à l'égard de l'hôte. Ces propriétés de virulence leur permettent de s'affranchir des mécanismes de défense de l'hôte afin de s'établir dans de nouvelles niches écologiques et d'exprimer leur pathogénicité. Selon les facteurs de virulence acquis et leur tropisme tissulaire, ces souches de *E. coli* pathogènes (ou pathovars) peuvent être à l'origine d'infections du tractus digestif, de l'arbre respiratoire, du tractus urinaire, mais également de méningites et de septicémies.

Des études menées au laboratoire « Evolution des bactéries pathogènes et susceptibilité génétique de l'hôte » ont permis de montrer que la muqueuse iléale des patients atteints de MC est anormalement colonisée par des souches de *E. coli* ayant la propriété d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales en culture. Ces souches sont également capables de survivre et de se multiplier fortement en macrophages sans induire de mort cellulaire, et les macrophages infectés sécrètent des taux élevés de TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha). Ainsi, un nouveau pathovar de *E. coli*, associé à la MC et dénommé AIEC pour « Adherent-Invasive *E. coli* » a été défini. La prévalence des AIEC au niveau des lésions iléales s'élève à 36,4% chez les patients atteints de MC contre seulement 6,2% chez



les sujets contrôles. Suite à une colonisation de l'épithélium intestinal, les souches AIEC pourraient, de par leur propriété d'invasion des cellules épithéliales intestinales, être capables de franchir la barrière intestinale et de se disséminer dans la muqueuse et dans les tissus sous-jacents. Les souches AIEC pourraient ensuite survivre et se multiplier fortement dans les macrophages résidents, en induisant une synthèse accrue de cytokines pro-inflammatoires conduisant à l'entretien de l'état inflammatoire.

Le travail qui m'a été proposé était d'étudier des déterminants génétiques impliqués dans le pouvoir pathogène des souches AIEC isolées de lésions iléales chroniques de patients atteints de MC.

Une première partie introductive de ce travail décrit la physiologie générale du système digestif, de la barrière intestinale, et le microbiote intestinal qui lui est associé. Une seconde partie fait le point sur la maladie de Crohn et présente les différents arguments en faveur d'une piste infectieuse de la MC. Une dernière partie fait le point sur les connaissances actuelles concernant le rôle des souches de *Escherichia coli* dans les processus inflammatoires intestinaux.

Dans une deuxième partie sont exposés et commentés les travaux effectués au cours de cette thèse. Ils concernent tout d'abord l'implication de la voie de signalisation dépendante du facteur de transcription  $\sigma^E$  dans la virulence des souches AIEC, et notamment dans leur capacité à former des biofilms. L'étude de l'implication des *long polar fimbriae* dans le ciblage des plaques de Peyer par les souches AIEC est par la suite décrite. Sont enfin exposés des résultats complémentaires concernant l'étude de la régulation de l'expression de ces *long polar fimbriae* en conditions gastro-intestinales. Enfin, dans une dernière partie, les principaux résultats font l'objet d'une discussion, et des perspectives à l'ensemble de ce travail sont proposées.





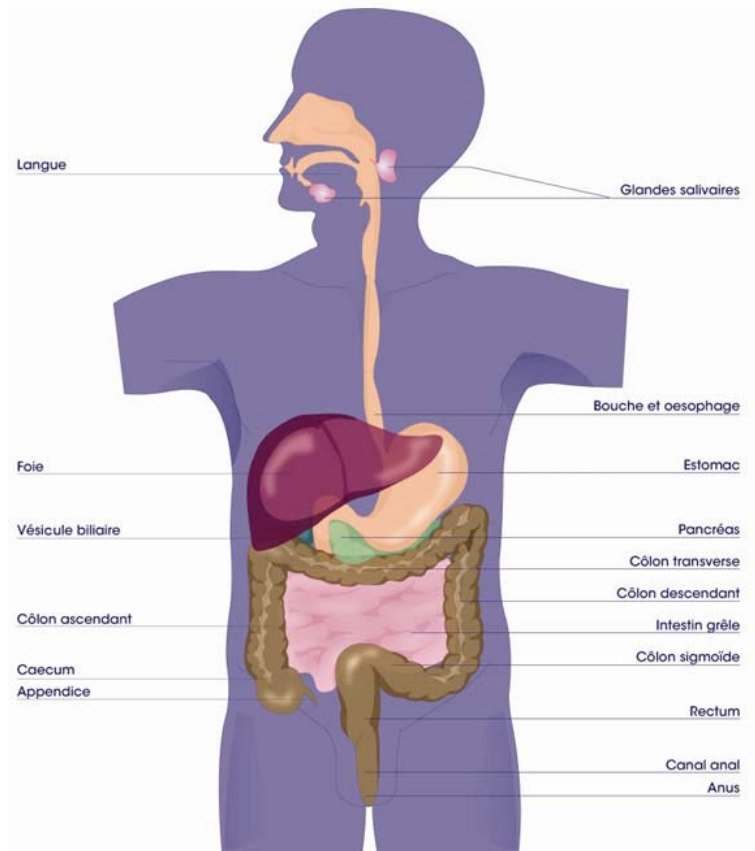
*ETUDE*

*BIBLIOGRAPHIQUE*









**Figure 2 : Organisation générale du système digestif humain.** Le système digestif est composé séquentiellement de la bouche, l'œsophage, l'estomac, le duodénum, le jéjunum, l'iléon, le caecum, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant, le côlon sigmoïde, le rectum et l'anus. De nombreuses glandes ou organes impliqués dans la digestion lui sont associés (glandes salivaires, foie, vésicule biliaire et pancréas).

## I- Le système digestif

### I-1- Physiologie générale du système digestif

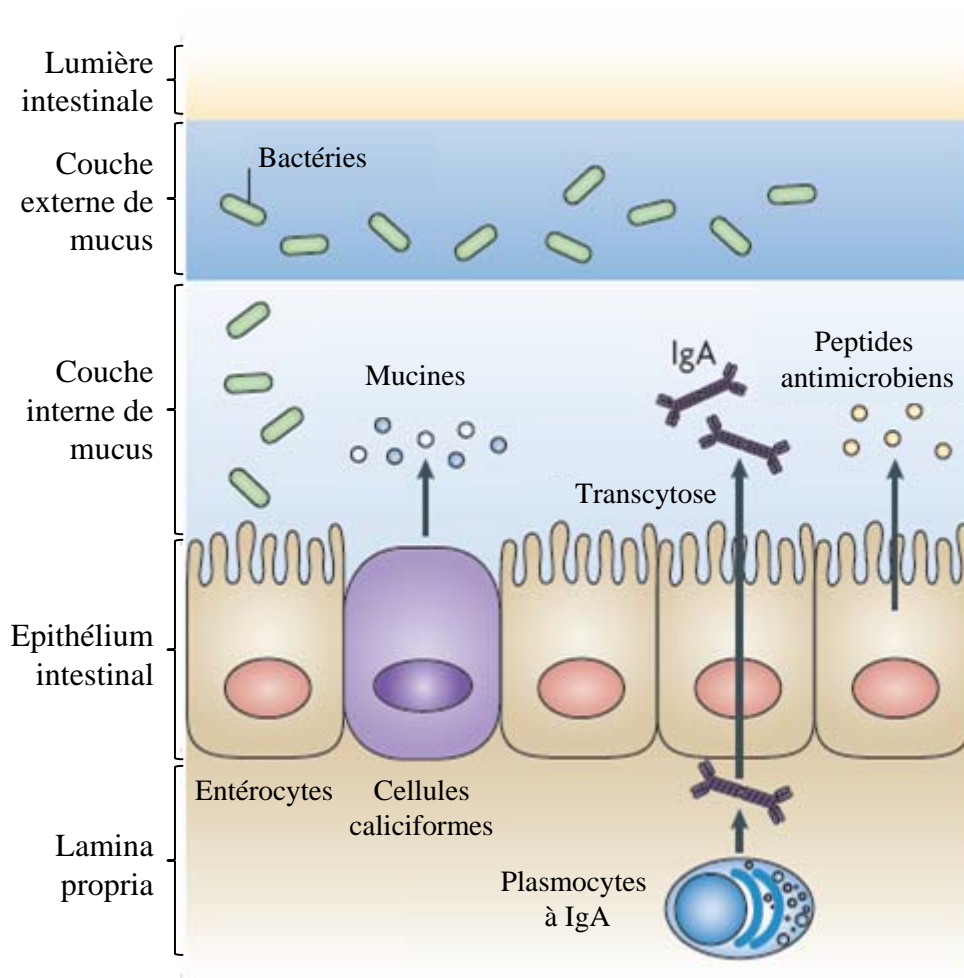
L'appareil digestif comporte le tube digestif proprement dit et les organes digestifs accessoires (Sherwood, 2006). Le tube digestif, d'une longueur moyenne de 4,5 m chez l'homme, est constitué de la bouche, du pharynx, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle (successivement duodénum, jéjunum et iléon), du gros intestin (successivement caecum et appendice, côlon ascendant, côlon transverse, côlon descendant, côlon sigmoïde et rectum) et de l'anus. Les organes digestifs accessoires sont les glandes salivaires, le pancréas, le foie et la vésicule biliaire (**Figure 2**). Comme le tube digestif est ininterrompu de la bouche à l'anus, sa lumière est en continuité avec l'environnement extérieur.

La paroi du tube digestif comporte quatre couches qui sont, de la lumière intestinale vers les couches plus profondes, la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse externe et la séreuse. La fonction majeure de l'appareil digestif est le transfert vers le milieu intérieur des nutriments, de l'eau et des électrolytes apportés par l'alimentation.

### I-2- Fonctions de l'épithélium digestif

L'épithélium digestif forme le revêtement interne de l'ensemble du tube digestif et sont au contact direct de la lumière digestive (Cadiot *et al.*, 2005). Il occupe donc une position clé à l'interface entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. Cette position explique son importance physiologique, puisqu'il participe, directement ou indirectement, à toutes les fonctions du tube digestif.

Une première fonction de l'épithélium digestif est de former une barrière protectrice entre le milieu extérieur, représenté par le contenu de la lumière digestive, et le milieu intérieur (Fenoglio-Preiser, 1997; Sternberg, 1992; Whitehead, 1997). Cette barrière est à la fois physique, chimique et immunitaire : physique, grâce à la cohésion des cellules épithéliales et à leurs interactions avec le tissu conjonctif sous-jacent ; chimique, grâce à la sécrétion de mucus et de substances défensives et protectrices ; immunitaire, grâce à la participation des cellules épithéliales à l'immunité innée et à leurs interactions avec le système lymphoïde annexé au tube digestif (Cadiot *et al.*, 2005).



**Figure 3 : Mécanismes de défense mis en place au niveau de la barrière intestinale pour limiter les interactions entre les bactéries de la lumière et les cellules épithéliales intestinales.** Les cellules caliciformes sécrètent des glycoprotéines permettant la formation de la couche de mucus. Les cellules épithéliales intestinales et les cellules de Paneth sécrètent des peptides antimicrobiens permettant l'élimination des bactéries ayant pénétré la couche de mucus. Les plasmocytes sécrètent des IgA qui, suite à leur transcytose à travers la barrière épithéliale intestinale, permettent de limiter le nombre de bactéries associées à la muqueuse, prévenant ainsi l'invasion bactérienne (modifiée d'après Hooper *et al.*, 2010).

L'épithélium digestif est également impliqué de manière directe dans le processus de digestion. Il facilite la progression du bol alimentaire, notamment par la sécrétion de mucus qui concourt à la lubrification de la paroi digestive. Il participe à la dégradation des aliments en sécrétant dans la lumière digestive de nombreuses enzymes. Il joue un rôle essentiel dans l'absorption des nutriments, qu'il capte dans la lumière digestive puis transporte, de manière souvent active et régulée, jusqu'au milieu intérieur. Enfin, il participe à la phase d'élimination des déchets en contrôlant les flux hydro-électrolytiques entre le milieu intérieur et la lumière digestive.

### I-3- Organisation et fonction de la barrière épithéliale intestinale

La structure et la très grande surface de la muqueuse gastro-intestinale favorisent la digestion et l'absorption efficaces des nutriments. En contrepartie, celle-ci constitue le principal site de contact entre l'organisme et les nombreux organismes et substances exogènes présents dans notre environnement (Cadiot *et al.*, 2005). La muqueuse est en effet exposée quotidiennement à une masse antigénique considérable représentée par les protéines alimentaires et les bactéries de la flore commensale, des antigènes utiles mais susceptibles d'induire des réactions allergiques ou inflammatoires. Elle est aussi confrontée régulièrement à des micro-organismes pathogènes capables, soit d'altérer la muqueuse et de compromettre sa fonction de digestion, soit de diffuser à distance et de léser les organes vitaux. Des moyens de défenses non immunologiques, barrière épithéliale, sécrétions digestives (enzymes et mucus), péristaltisme intestinal, et flore microbienne saprophyte limitent de façon efficace le contact et l'entrée des antigènes intraluminaux. Cette première ligne de protection est complétée par un système immunitaire complexe composé d'un nombre très important de cellules de l'immunité innée et adaptative qui coopèrent pour assurer une fonction de défense anti-infectieuse mais aussi la régulation de la réponse inflammatoire (Cadiot *et al.*, 2005; Cerf-Bensussan, 2005).

La protection efficace de l'intestin vis-à-vis des bactéries pathogènes, des virus, des toxines et des allergènes présents naturellement dans la lumière intestinale est assurée par différents mécanismes, tels que la sécrétion de mucus, la synthèse de peptides anti-microbiens et d'IgA, et la cohésion cellulaire au sein de l'épithélium (**Figure 3**).





### I-3-1- Le mucus

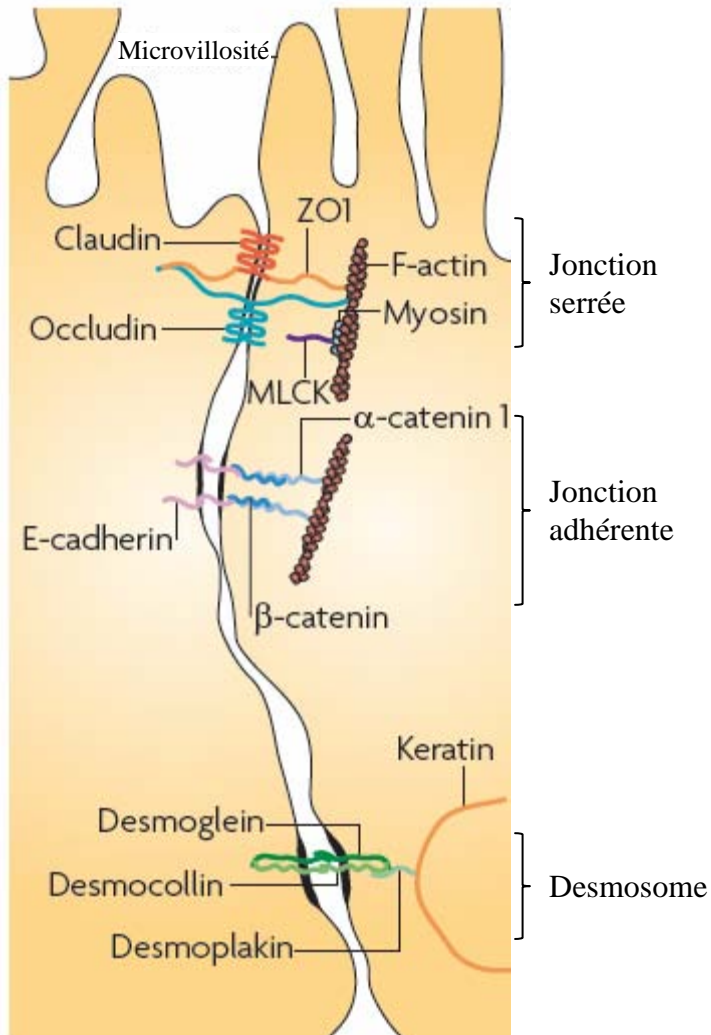
Le mucus est produit de façon continue par des cellules épithéliales spécialisées : les cellules caliciformes. Il constitue une barrière physique protégeant le tissu sous-jacent des microorganismes, des toxines qu'ils produisent, et de toutes autres substances potentiellement nocives présentes dans la lumière intestinale. Le mucus, tapissant la face luminale de l'épithélium intestinal, est un gel viscoélastique composé de 95% d'eau et de 5% de mucines sécrétées ou adhérentes. Le mucus est constitué de deux couches :

- la couche interne, située juste au-dessus de la membrane plasmique, a une épaisseur moyenne comprise entre 50 et 60  $\mu\text{m}$ , et assure la protection de l'épithélium. Elle contient et concentre les peptides antimicrobiens et les IgA, établissant ainsi une barrière étanche aux bactéries et permettant leur maintien à distance de l'épithélium.

- la couche externe, constamment renouvelée, a une fonction de lubrification et contient un nombre important de bactéries.

Dans l'intestin, l'érosion mécanique ou protéolytique de la couche de mucus luminal est due au frottement du chyme en cours de digestion et à l'action d'enzymes. Cette érosion doit être compensée par des sécrétions de mucus en provenance des cellules caliciformes de la muqueuse afin de garantir l'intégrité de la barrière, première ligne de défense contre les agressions extérieures.

Les principaux composants du mucus, responsables de ses propriétés viscoélastiques et gélifiantes, sont les mucines. Les différentes mucines rencontrées chez les mammifères ont des caractéristiques communes : ce sont des glycoprotéines de très haut poids moléculaire (entre 250 et 30000 kDa) formées d'un squelette peptidique (l'apomucine) et de chaînes glucidiques (environ 60 à 80% du poids de la mucine) rattachées majoritairement au peptide par des liaisons O-glycosidiques sur les résidus sérine et thréonine de l'apomucine, ou de manière plus rare par des liaisons N-glycosidiques sur les résidus asparagine (Andrianifahanana *et al.*, 2006). Ces chaînes glucidiques, hérissées de part et d'autre de l'apoprotéine, donnent aux mucines une forme d'écouvillon, présentant des régions fortement glycosylées résistantes aux protéases. Cette forte glycosylation confère également aux mucines leur forte densité et leur grande viscosité.



**Figure 4 : Organisation des jonctions intercellulaires au niveau de l'épithélium intestinal.** L'épithélium intestinal est constitué d'une monocouche de cellules dont la cohésion est assurée par plusieurs types de jonctions intercellulaires, tel que les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes (modifiée d'après Turner, 2009).

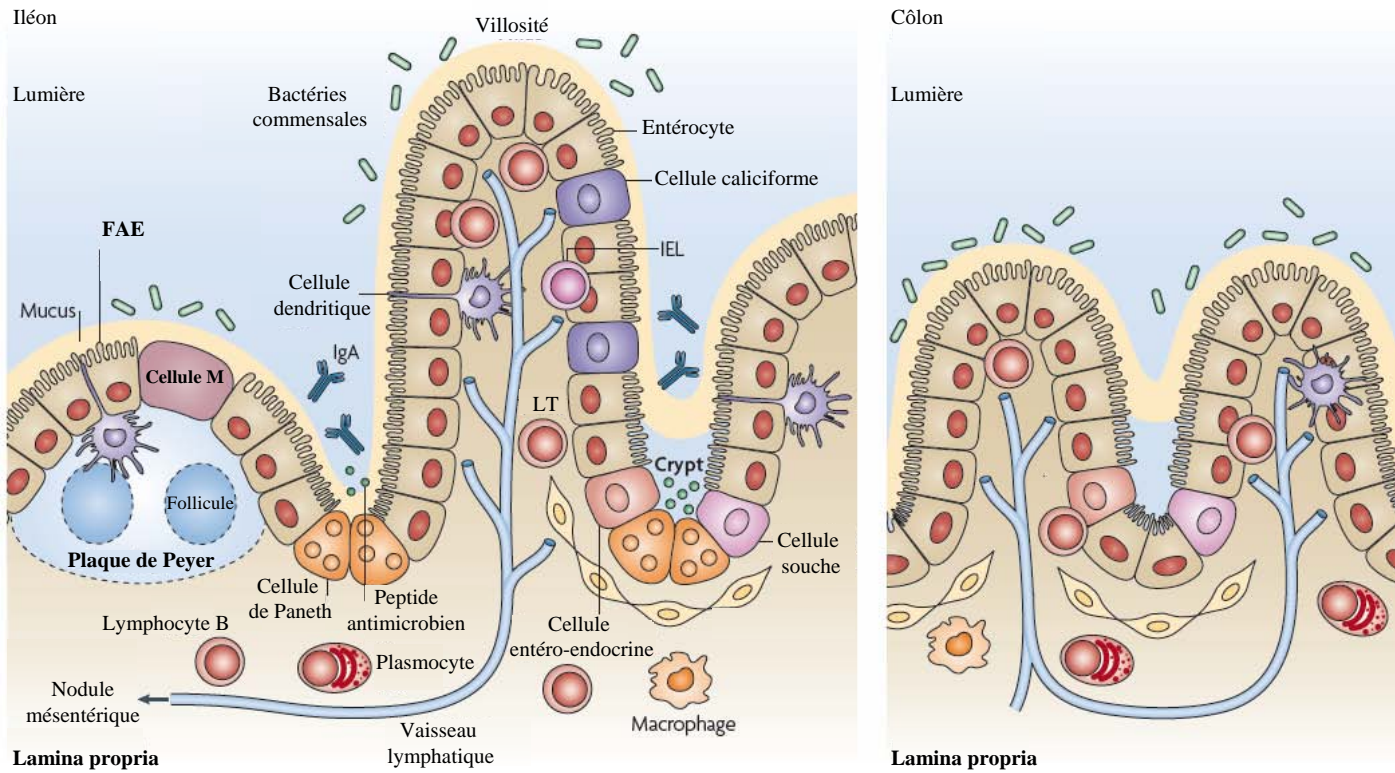
### I-3-2- Les peptides antimicrobiens et les IgA

Plusieurs molécules anti-microbiennes sécrétées par l'épithélium intestinal participent à l'intégrité de la barrière intestinale. Elles regroupent les défensines, les cathélicidines et les lectines de type C qui sont concentrées dans la couche interne de mucus, formant ainsi une véritable barrière protectrice fortement bactéricide car la plupart de ces molécules a une action lytique directe sur la paroi bactérienne (Bulet *et al.*, 2004). Les peptides anti-microbiens peuvent être sécrétés par tous les types cellulaires de l'épithélium digestif, incluant les entérocytes, les cellules caliciformes et les cellules de Paneth ; ces dernières étant les cellules spécialisées dans ce processus. La régulation de la sécrétion de ces peptides est complexe et mal connue. Si la sécrétion des  $\alpha$ -défensines est constitutive, celle d'autres peptides comme RegIII $\gamma$  est induite par des stimuli microbiens via l'activation des récepteurs extracellulaires tels que les *Toll-like receptors* (TLR), ou des récepteurs intracellulaires tels que les NOD (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain*). A titre d'exemple, NOD2 a été impliqué dans la régulation de l'expression des  $\alpha$ -défensines par les cellules de Paneth (Wehkamp *et al.*, 2004).

La couche interne du mucus concentre également de nombreuses IgA qui interviennent dans les réponses immunitaires au niveau de la muqueuse intestinale en empêchant l'adhésion des microorganismes aux cellules épithéliales, en neutralisant certaines toxines, et en agglutinant les bactéries et les champignons. Contrairement à la synthèse des molécules anti-microbiennes, le mécanisme mis en place au niveau de la muqueuse intestinale pour la synthèse des IgA fait intervenir le système immunitaire adaptatif. Ce mécanisme sera plus amplement détaillé ultérieurement, dans le paragraphe I-3-4-2-3.

### I-3-3- Les jonctions intercellulaires et la perméabilité intestinale

L'épithélium intestinal est constitué d'une monocouche de cellules dont la cohésion est assurée par plusieurs types de jonctions intercellulaires (**Figure 4**). Les jonctions serrées se situent au pôle apical des cellules épithéliales et sont composées d'un complexe multi-protéique incluant des protéines transmembranaires de la famille des claudines. A ce niveau, la claudine et l'occludine (protéines transmembranaires) interagissent avec ZO1 et ZO2 (pour Zonula Occludens) et l'actine du cytosquelette (Turner, 2009). Ces jonctions serrées jouent un



**Figure 5 : Organisation du système immunitaire intestinal.** L'épithélium intestinal constitue une barrière physique qui permet de séparer le microbiote intestinal de la lamina propria sous jacente. Il est constitué d'entérocytes, de cellules caliciformes impliquées dans la production de mucus, de cellules de Paneth spécialisées dans la production de peptides antimicrobiens et de cellules souches qui assurent le renouvellement cellulaire. Sous cette monocouche de cellules se trouve la lamina propria, dans laquelle des lymphocytes B, et plus particulièrement des plasmocytes producteurs d'IgA, mais également des lymphocytes T, des macrophages, et des cellules dendritiques sont retrouvées. Au niveau de l'iléon, des plaques de Peyer, présentant un épithélium spécial avec la présence de cellules M, sont retrouvées et permettent l'échantillonnage du contenu luminal. IEL, lymphocyte intra-épithélial; LT, lymphocyte T; FAE, *follicle-associated epithelium* (modifiée d'après Abreu, 2010).

rôle majeur dans la perméabilité membranaire en étant un élément de contrôle des flux paracellulaires.

Sous les jonctions serrées se trouvent les jonctions adhérentes, composées de protéines de la famille des cadhérines : E-cadhérine,  $\beta$ -caténine, caténine  $\delta 1$  et  $\alpha$ -caténine 1. Outre leur fonction dans la cohésion intercellulaire, les protéines des jonctions adhérentes sont également impliquées dans le maintien de la polarisation, dans la différenciation cellulaire, ainsi que dans la communication intercellulaire.

Enfin, les desmosomes sont formés d'interactions entre la desmoglérine, la desmocolline, la desmoplakine, et les filaments de kératines du cytosquelette. Ce complexe fonctionnel permet le passage de protéines, de lipopolysaccharide (LPS) bactérien, mais ne permet pas le passage de bactéries entières.

#### I-3-4- Le tissu lymphoïde associé à l'intestin

##### I-3-4-1- Généralités

Le système immunitaire intestinal joue un rôle majeur dans la tolérance de la microflore commensale intestinale (**Figure 5**), (Abreu, 2010). Les macrophages de la sous-muqueuse assurent la phagocytose et la bactéricidie de bactéries commensales réussissant à franchir l'épithélium lorsqu'une perte de son intégrité survient (Kelsall, 2008). A l'inverse des bactéries pathogènes qui ont acquis des moyens d'évasion ou de résistance aux cellules phagocytaires, les bactéries commensales y sont très sensibles.

En situation physiologique, le système immunitaire adaptatif permet l'établissement et le maintien de la tolérance vis-à-vis de la flore commensale, grâce notamment aux lymphocytes T  $CD4^+$  régulateurs ( $T_{reg}$ ). Parmi les  $T_{reg}$  du tractus digestif on distingue deux types : les  $T_{reg} CD4^+ FOXP3^+$  de la lamina propria du côlon et de l'intestin grêle, et les T régulateurs 1 (Tr-1)  $CD4^+ FOXP3^- IL-10^+$  localisés en position intra-épithéliale et dans la lamina propria de l'intestin grêle (Barnes and Powrie, 2009; Hooper and Macpherson, 2010). Ces  $T_{reg}$  jouent un rôle majeur dans l'homéostasie intestinale, en produisant notamment des cytokines régulatrices telles que le TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor beta*) et l'IL-10. Le rôle joué par ces  $T_{reg}$  et les cytokines qu'ils sécrètent est appuyé par les modèles animaux invalidés pour l'IL-10 ou pour le TGF- $\beta$ , qui développent une



inflammation intestinale exacerbée en réponse à la flore commensale (Kuhn *et al.*, 1993; Kulkarni *et al.*, 1995). Ces observations expérimentales soulignent le rôle capital des T<sub>reg</sub> dans le contrôle des réponses immunitaires vis-à-vis de la flore commensale. Il est important de noter que certains produits bactériens issus de bactéries commensales, comme le polysaccharide A de *Bacteroides fragilis*, sont capables d'induire ces populations de T<sub>reg</sub> (Mazmanian *et al.*, 2008).

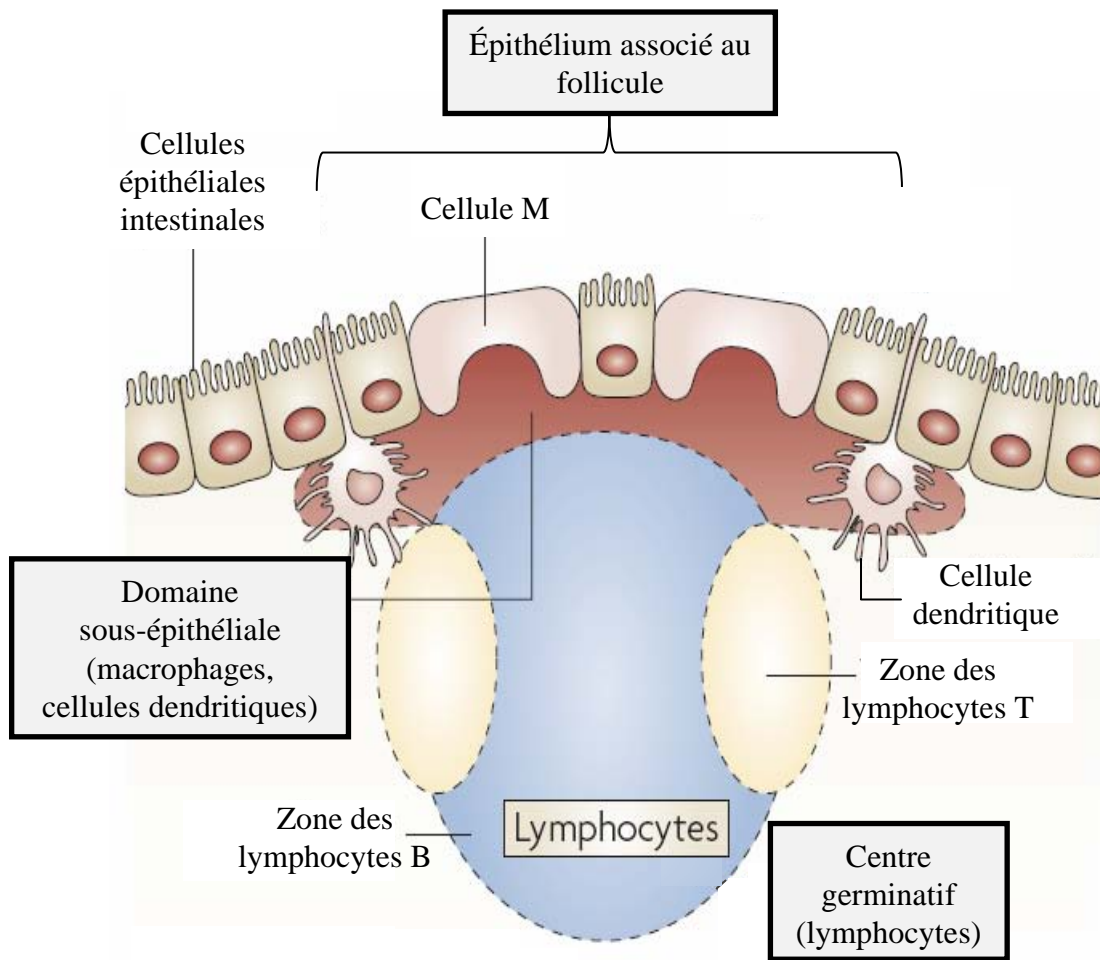
Les cellules dendritiques intestinales ont un rôle majeur dans la coordination de la réponse immunitaire adaptative et dans l'équilibre entre les différentes populations lymphocytaires. Plusieurs sous-populations de cellules dendritiques de la lamina propria ont été décrites. Les cellules dendritiques CX3CR1<sup>+</sup> ont la capacité d'émettre des protrusions transépithéliales afin de réaliser un échantillonnage d'antigène de la lumière intestinale (Rescigno *et al.*, 2001). Les cellules dendritiques CD103<sup>+</sup> ont quant à elles la capacité de migrer aux ganglions mésentériques et d'induire des réponses régulatrices (Rescigno *et al.*, 2001). Par ailleurs, il existe des cellules dendritiques associées aux plaques de Peyer (CCR6<sup>+</sup>) qui effectuent également un échantillonnage des éléments de la flore commensale. A l'état basal, le microenvironnement tissulaire conditionne les cellules dendritiques à induire une réponse régulatrice, via notamment le TGF- $\beta$  et l'acide rétinoïque.

Les cellules dendritiques, professionnelles dans la présentation d'antigènes, sont capables d'induire des réponses immunitaires adaptatives par présentation des antigènes aux lymphocytes T. Même si de telles réponses sont possibles tout le long de l'épithélium intestinal, les plaques de Peyer sont des organes spécialisés dans ce mécanisme.

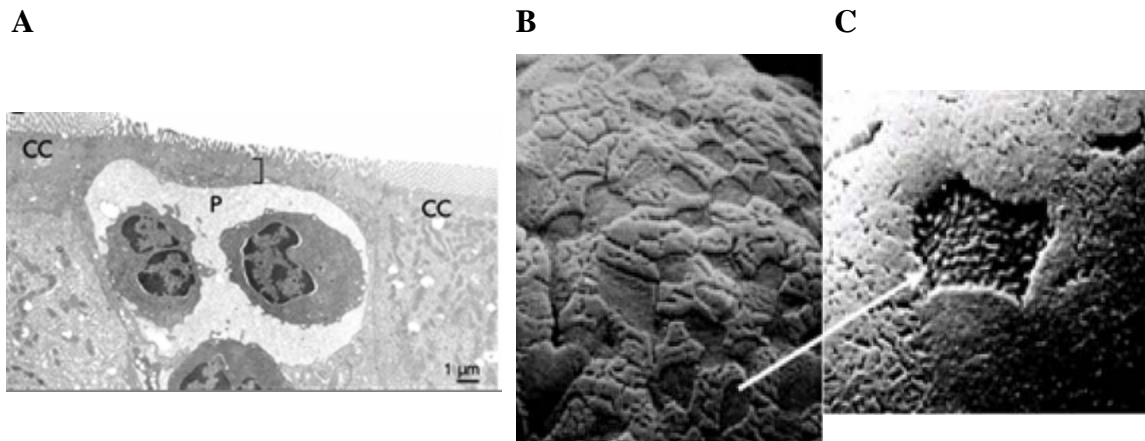
#### I-3-4-2- Les plaques de Peyer

Découvertes par le Suisse Johan Peyer (1653-1712), les plaques de Peyer sont des organes lymphoïdes secondaires associés au tube digestif (*Gut Associated Lymphoid Tissue* ou GALT), sous-système du MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue* ou tissu lymphoïde associé aux muqueuses). L'intestin contient de très nombreux follicules lymphoïdes situés entre la muqueuse et la sous-muqueuse, parfois agrégés pour former les plaques de Peyer au niveau de l'iléon. Ces dernières sont impliquées dans l'échantillonnage d'antigènes présents dans la lumière intestinale et leur présentation au système immunitaire sous-jacent (Junt *et al.*, 2008; Kiyono and Fukuyama, 2004).





**Figure 6 : Représentation schématique d'une plaque de Peyer.** L'échantillonnage antigénique réalisé par les cellules M permet, via les cellules présentatrices d'antigènes, la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative mettant en jeu les lymphocytes T et B (modifiée d'après Junt *et al.*, 2008).



**Figure 7 : Observation par microscopie électronique de l'épithélium associé aux plaques de Peyer.** Observation par microscopie électronique à transmission (A) et à balayage (B-C) de l'épithélium associé aux plaques de Peyer. Le grossissement observé en C permet de bien observer la disparition des microvillosités à la surface des cellules M.

#### I-3-4-2-1- Ontogenèse des plaques de Peyer

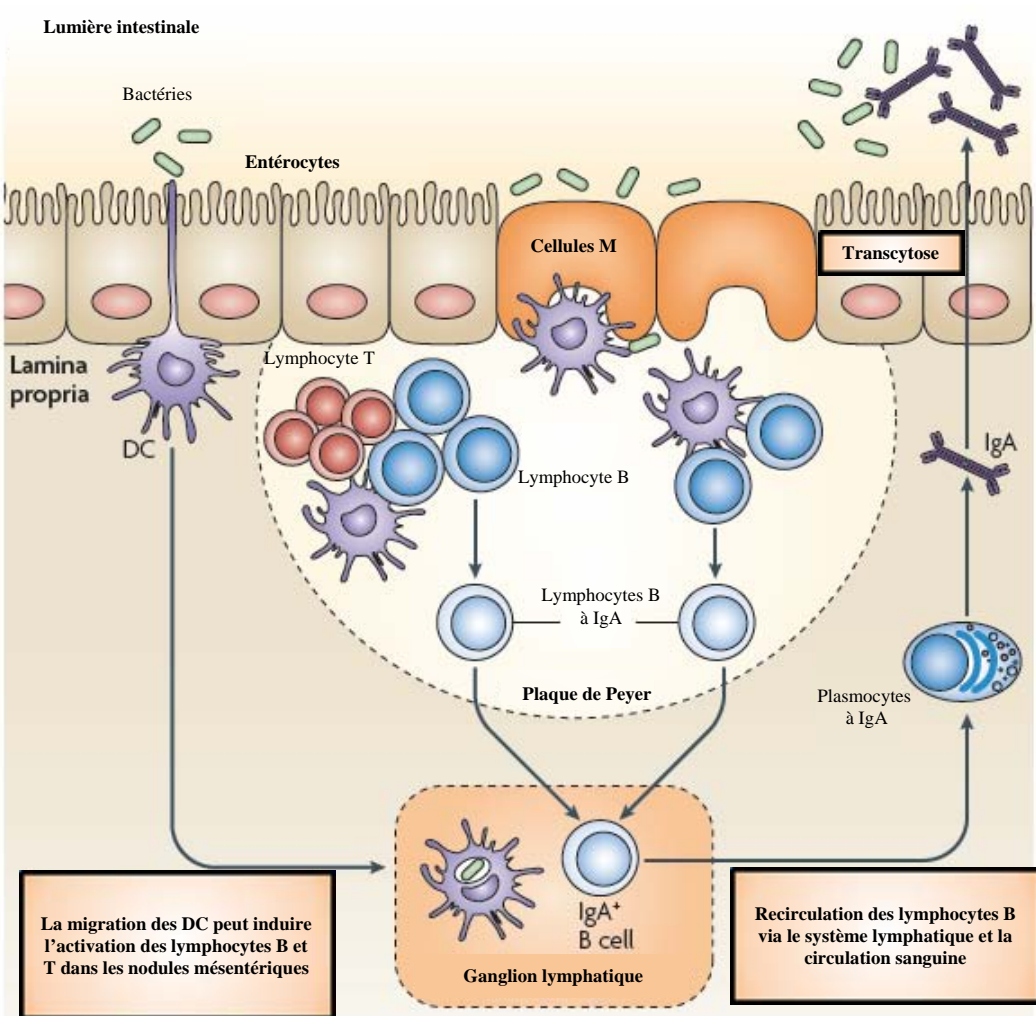
Les plaques de Peyer se développent au cours de la vie fœtale simultanément aux ganglions lymphoïdes périphériques, à partir de la 15-16<sup>ème</sup> semaine. La formation des plaques de Peyer nécessite l'intervention coordonnée de nombreuses molécules : l'IL-7, la chimiokine BLA qui exerce un effet attractif sur les lymphocytes B, et les lymphotoxines alpha et bêta. Après la naissance, les stimulations intraluminales induisent la prolifération des lymphocytes B et T, la formation des centres germinatifs et l'augmentation de la taille et du nombre des plaques de Peyer.

#### I-3-4-2-2- Description des plaques de Peyer

Les plaques de Peyer sont constituées d'un nombre variable de follicules B (20-300) contenant un centre germinatif où s'activent et prolifèrent les lymphocytes B. Ceux-ci sont séparés par des zones inter-folliculaires impliquées dans l'activation des lymphocytes T et sont surmontés par le dôme, riche à la fois en lymphocytes B et T et en macrophages (**Figure 6**). Les plaques de Peyer font directement saillie dans la lumière intestinale, et l'épithélium recouvrant le dôme est dépourvu de villosité et favorise l'entrée des antigènes (Neutra *et al.*, 1996b).

L'entrée élective de nombreux antigènes intraluminaux, solubles ou particuliers, à travers l'épithélium du dôme des plaques de Peyer se fait par les cellules M (cellule « microfold » ou « membranous) (Neutra *et al.*, 1996b). Ces cellules, qui forment 5 à 10% des cellules épithéliales du dôme, sont intercalées entre les entérocytes. Leur différenciation se ferait à partir des entérocytes sous l'influence des lymphocytes, en particulier des lymphocytes B des follicules sous-jacents (Kerneis *et al.*, 1997).

Les cellules M ont une morphologie facilement identifiable en microscopie électronique (**Figure 7**). Elles sont dépourvues de membranes basale et de bordure en brosse et forment des replis membranaires qui délimitent une poche intra-épithéliale dans laquelle viennent se loger des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, des lymphocytes B et des macrophages. Ces cellules M sont capables d'endocyter de façon efficace les macromolécules et les particules qui adhèrent à leur surface apicale, de les transporter et de les transmettre en 10 à 15 minutes au niveau de la poche. Il a été montré que l'efficacité et la vitesse de cette capture par les cellules M était dépendante de la taille de l'antigène (Awaad *et al.*, 2011). Les cellules M



**Figure 8 : Rôle immunitaire joué par les plaques de Peyer.** Les antigènes de la lumière intestinale sont transportés au sein des plaques de Peyer *via* les cellules M. Ces antigènes sont alors présentés, via les cellules présentatrices d'antigènes, aux lymphocytes T et B. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ainsi stimulés vont préférentiellement induire le développement de lymphocytes B à IgA. Les lymphocytes B vont alors migrer des plaques de Peyer aux ganglions lymphatiques. Les lymphocytes B IgA<sup>+</sup> se différencient par la suite en plasmocytes, permettant la production d'IgA dimériques. Ces IgA dimériques sont par la suite sécrétées dans la lumière intestinale. DC, cellules dendritiques (modifiée d'après Hooper *et al.*, 2010).

permettent donc essentiellement l'entrée des antigènes et leur transport au contact des nombreuses cellules de l'immunité présentes dans le dôme (Cadiot *et al.*, 2005; Cerf-Bensussan, 2005; Neutra *et al.*, 1996a). Il a également été montré que les cellules dendritiques associées aux plaques de Peyer sont elles aussi capables de réaliser un échantillonnage antigénique suite à l'émission de protrusions passant à travers les cellules M (Lelouard *et al.*, 2011).

#### I-3-4-2-3- Fonction des plaques de Peyer

Les antigènes ayant pénétré au niveau des cellules M sont captés par les cellules présentatrices d'antigènes. Ceci est l'étape initiatrice des réponses immunitaires adaptatives dans la muqueuse intestinale (**Figure 8**). L'activation des cellules présentatrices d'antigènes, présentes en très grand nombre au niveau du dôme et de la couronne de follicules, se traduit par une forte augmentation de l'efficacité de présentation de l'antigène, par la perte du récepteur CCR6 et par l'acquisition du récepteur CCR7, récepteur aux chimiokines MIP3 $\beta$  et SLC leur permettant de migrer vers la zone T inter-folliculaire des plaques de Peyer pour activer les lymphocytes T et B.

Une particularité des lymphocytes B de la muqueuse intestinale est leur différenciation préférentielle vers la synthèse d'IgA. Le rôle du TGF $\beta$  et de l'IL-10 dans la commutation de classe des lymphocytes B vers les lymphocytes sécréteurs d'IgA a été démontré *in vitro* et *in vivo* (Borsutzky *et al.*, 2004; Cazac and Roes, 2000). Ce TGF $\beta$  est synthétisé par de nombreuses cellules dans l'intestin : épithélium, macrophages et cellules dendritiques, et certaines sous-populations de lymphocytes T.

#### I-3-4-2-4- Migration des lymphocytes T et des plasmocytes à IgA dans la muqueuse intestinale

Les lymphocytes T et B IgA<sup>+</sup> quittent les plaques de Peyer par le réseau lymphatique sous-séreux pour gagner les ganglions mésentériques (Hooper and Macpherson, 2010). Ces formations lymphoïdes, favorisent l'amplification des réponses initiées dans les plaques de Peyer et la différenciation des lymphocytes sensibilisés. Après un bref séjour dans ces



ganglions, les lymphocytes rejoignent la circulation générale par le canal thoracique. Les études de la circulation des lymphocytes chez l'animal montrent que les lymphocytes récemment sensibilisés dans les tissus lymphoïdes intestinaux retournent se domicilier préférentiellement dans la muqueuse intestinale. Ce cycle hémolympatique des plasmocytes à IgA permet ainsi de redistribuer une réponse anticorps initiée au niveau du duodénum à l'ensemble de l'intestin grêle et au côlon ascendant, ainsi que vers les glandes salivaires et la glande mammaire en lactation.

La présence de lymphocytes T muqueux, en particulier de lymphocytes intra-épithéliaux, chez des souris dépourvues de plaques de Peyer indique que ces lymphocytes répondent à un schéma d'activation différent des T conventionnels sans passer par les plaques de Peyer et le cycle hémolympatique (Cheroutre, 2004).

Ainsi, le système lymphoïde associé à l'intestin est étroitement lié à l'épithélium intestinal par de multiples interactions, tant au niveau du compartiment inductif de la réponse immunitaire intestinal dans les plaques de Peyer, que dans le compartiment effecteur. Ce système lymphoïde exerce une double fonction de protection contre les pathogènes et de régulation pour éviter l'emballement des réponses inflammatoires sous l'effet des multiples antigènes intraluminaux.

#### I-3-4-2-5- Les plaques de Peyer : une porte d'entrée pour des bactéries pathogènes

Le rôle des cellules M est donc de réaliser un échantillonnage d'antigènes présents dans la lumière intestinale et de les délivrer au système immunitaire. Ces caractéristiques font des cellules M une piste de choix en vue de l'élaboration de vaccins innovants administrables par voie mucoale, mais également une cible de choix pour de nombreuses bactéries pathogènes voulant accéder à la lamina propria (Kuolee and Chen, 2008; Neutra *et al.*, 1996a).

Ainsi, les données cliniques et expérimentales indiquent que, au moins lors des phases précoces de l'infection, les cellules M de l'épithélium associé aux plaques de Peyer pourraient transporter des bactéries pathogènes (Sansonetti and Phalipon, 1999). Par exemple, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium est capable de cibler ces cellules M (Jones *et al.*, 1994) via l'expression de *long polar fimbriae* (Baumler *et al.*, 1996a). *Yersinia* utilise quant à elle ses invasines pour se lier aux intégrines  $\beta 1$ , exprimées au niveau de la membrane apicale



des cellules M (Isberg *et al.*, 1987; Isberg and Leong, 1990). De plus, il a récemment été démontré que la glycoprotéine GP2, spécifiquement exprimée à la surface des cellules M, permet l'adhésion d'entérobactéries commensales et pathogènes telles que *Salmonella enterica* serovar Typhimurium et *Escherichia coli* (Hase *et al.*, 2009). Cette étude a

montrer que c'est l'adhésine FimH, composant des pili de type 1, qui permet cette interaction avec les cellules M et la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique au sein des plaques de Peyer.

#### I-3-4-2-6- Ciblage des plaques de Peyer et intérêts thérapeutiques

De nombreuses études ont utilisé comme vaccin des souches bactériennes ou virales atténuées en virulence et capables de cibler l'épithélium associé aux plaques de Peyer. Par exemple, la souche de *S. typhi* Ty21a permet d'immuniser contre la fièvre typhoïde (Cryz *et al.*, 1993).

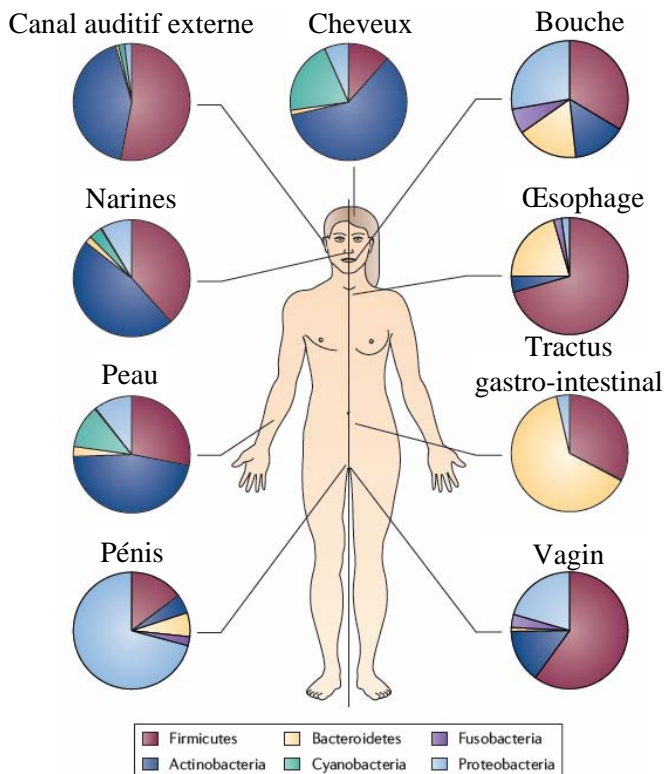
De plus, le ciblage des cellules M (par exemple via la glycoprotéine GP2) constituerait un mode de vectorisation innovant pour délivrer au système immunitaire des antigènes hétérologues. Des recherches ont ainsi été conduites sur *Shigella* spp. (Suzuki *et al.*, 2006), *Helicobacter pylori* (Londono-Arcila *et al.*, 2002), et l'infection à VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) (Crotty *et al.*, 2001). De nombreuses recherches sont également en cours dans le but d'utiliser des particules synthétiques, telles que des microparticules de poly-lactide co-glycolide ou des liposomes, toujours dans le but de cibler spécifiquement les cellules M.

L'ensemble de ces données montre ainsi que tout est mis en œuvre par la barrière épithéliale intestinale et le système immunitaire sous-jacent pour se prémunir d'une éventuelle agression par une bactérie pathogène tout en maintenant une relation de tolérance entre flore commensale et hôte.

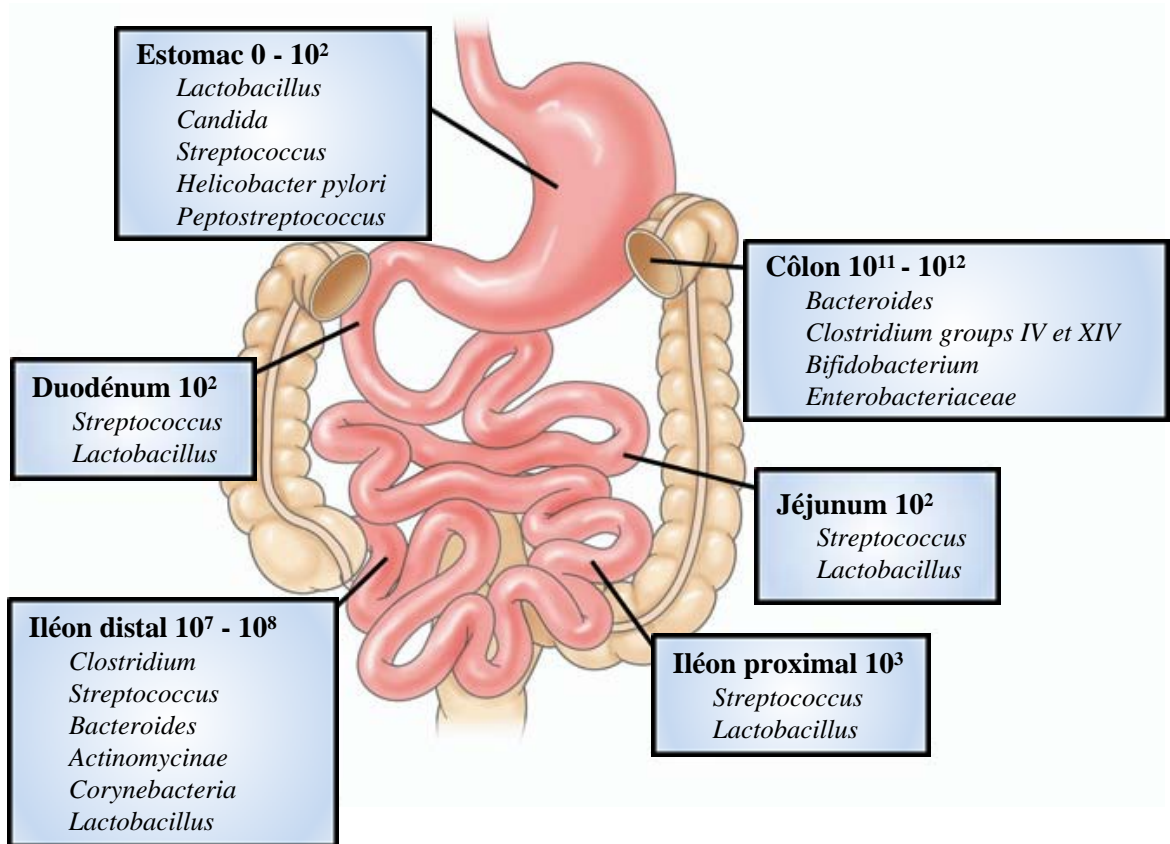
#### I-4- La flore microbienne intestinale

Le tube digestif héberge à l'état naturel de nombreux micro-organismes avec lesquels il forme une symbiose. La microflore exerce de nombreuses fonctions physiologiques,





**Figure 9 : Composition des communautés microbiennes associées au corps humain.** L'abondance relative des six groupes phylogénétiques majeurs est représentée pour les différentes parties du corps hébergeant un écosystème microbien (modifiée d'après Spor *et al.*, 2011).



**Figure 10 : Composition et concentration des espèces microbiennes dominantes dans les différentes régions du tractus gastro-intestinal** (modifiée d'après Sartor, 2008).

notamment la fermentation et l'effet de barrière par lequel elle s'oppose à la colonisation de l'intestin par des micro-organismes pathogènes.

Dès la naissance, les microorganismes colonisent le nouveau-né et établissent une relation mutuelle avec leur hôte. L'ensemble des muqueuses en contact avec l'environnement extérieur présente un écosystème microbien complexe à leur surface (**Figure 9**) (Spor *et al.*, 2011). Le terme microbiote intestinal définit l'ensemble des microorganismes qui peuplent le tractus digestif d'un individu (Savage, 1977). Ce microbiote constitue une biomasse très importante, comprenant notamment des centaines d'espèces bactériennes différentes. Cet environnement microbien dense est à l'origine d'une intense activité fonctionnelle qui le rend physiologiquement très important pour l'Homme. On parle d'un « organe microbien » faisant partie intégrante de l'hôte (O'Hara and Shanahan, 2006). La densité de cette flore varie le long du tractus gastro-intestinal (**Figure 10**). Elle est assez faible, de l'ordre de  $10^1$  à  $10^2$  bactéries par gramme de fèces au niveau stomacal, duodénal et jéjunal puis augmente au niveau de l'iléon avec  $10^7$  à  $10^8$  bactéries par gramme de fèces. La flore microbienne est principalement abondante au niveau colique où la diversité et la densité de la population bactérienne sont maximales avec plus de 400 espèces bactériennes présentes et  $10^{11}$  à  $10^{12}$  bactéries par gramme de fèces. La caractérisation de la composition du microbiote basée sur la réalisation de cultures ne peut prendre en compte qu'environ 30 % au maximum des microorganismes (Finegold *et al.*, 1974; Holdeman *et al.*, 1976; Moore and Holdeman, 1974). Ainsi, la prise en compte des microorganismes non cultivables grâce au séquençage des ARN ribosomiques 16S a affiné cette vision, pour la placer dans un cadre phylogénétique. Le phylum des Firmicutes est toujours fortement représenté. Il comprend les espèces appartenant aux genres *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio* (Franks *et al.*, 1998; Jansen *et al.*, 1999; Rigottier-Gois *et al.*, 2003; Seksik *et al.*, 2003; Sghir *et al.*, 2000). Les Bacteroidetes sont représentés par des genres liés à *Bacteroides*. Ils sont toujours présents et partagent la dominance avec les groupes indiqués ci-dessus (9 à 42 % des bactéries totales en moyenne). Le phylum des Actinobacteria est moins systématiquement détecté comme dominant, et il représente un petit pourcentage des bactéries totales. Il comprend les bifidobactéries (0,7 à 10 %) et les bactéries du groupe *Collinsella-Atopobium* (0,3 à 3,7 % en moyenne) (Harmsen *et al.*, 2000; Rigottier-Gois *et al.*, 2003). Les entérobactéries sont plus rarement observées (0,4 à 1 %), comme c'est également le cas des lactobacilles et des streptocoques (2 %) (Lay *et al.*, 2005).



Très récemment, deux études ont eu pour but non pas le séquençage des ARN ribosomique 16S bactériens, mais le séquençage de l'intégralité du matériel génétique présent dans le microbiote humain par une approche de métagénomique (Nelson *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2010). Ces données ont une nouvelle fois affiné la vision du microbiote, car cette base de données permet désormais une caractérisation fonctionnelle du microbiote intestinal. Cette base de données contient 3,3 millions de gènes non redondants, soit 150 fois plus que le génome humain. Ce contenu correspond à près de 1000 espèces bactériennes, représentant probablement la grande majorité des espèces de l'intestin humain.

La composition globale de la communauté microbienne intestinale dominante semble constante entre les individus et dans le temps. En effet, les mêmes phylums majeurs sont présents, et la diversité des espèces dominantes apparaît remarquablement stable dans le temps pour un individu. Il est désormais bien établi que toute modification du nombre et de la composition de la flore peut impacter fortement sur la physiologie de l'intestin. Ainsi, une dysbiose est suspectée pour le syndrome de l'intestin irritable (Kassinen *et al.*, 2007), la rectocolite hémorragique (RCH) (Martinez *et al.*, 2008; Sokol *et al.*, 2008b), l'obésité (Kalliomaki *et al.*, 2008; Ley *et al.*, 2005), le diabète de type I (Dessein *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2008), le diabète de type II (Cani and Delzenne, 2009), la maladie coéliqua (Collado *et al.*, 2009; Nadal *et al.*, 2007), l'allergie (Bjorksten, 2009; Kirjavainen *et al.*, 2002), l'autisme (Finegold *et al.*, 2002; Parracho *et al.*, 2005), les troubles cardiovasculaires (Crawford *et al.*, 2009) et dans des cas d'infections à *Clostridium difficile* (Hickson *et al.*, 2007) ou au VIH (Gori *et al.*, 2008). De nombreuses études incriminent également un rôle majeur joué par le microbiote intestinal dans la survenue de la maladie de Crohn (Joossens *et al.*, ; Kang *et al.*, 2010; Marteau and Chaput, ; Qin *et al.*, 2010; Seksik *et al.*, 2005; Sokol *et al.*, 2008a; Walker *et al.*, ; Willing *et al.*, 2009). De plus, la récente analyse du microbiote intestinal par métagénomique a confirmé qu'il existe une variation de la flore microbienne entre les patients sains et les patients atteints de RCH d'une part, et les patients atteints de maladie de Crohn d'autre part (Qin *et al.*, 2010). Cependant, l'ensemble de ces observations n'indiquent pas un lien de causalité entre le déséquilibre du microbiote observé et l'apparition des différentes pathologies, et il est envisageable pour certaines pathologies que la dysbiose soit en réalité une conséquence plutôt qu'une cause.

# Regional Ileitis

## A Pathologic and Clinical Entity

Burrill B. Crohn, M.D.

Leon Ginzburg, M.D.

and

Gordon D. Oppenheimer, M.D.

New York

We propose to describe, in its pathologic and clinical details, a disease of the terminal ileum, affecting mainly young adults, characterized by a subacute or chronic necrotizing and cicatrizing inflammation. The ulceration of the mucosa is accompanied by a disproportionate connective tissue reaction of the remaining walls of the involved intestine, a process which frequently leads to stenosis of the lumen of the intestine, associated with the formation of multiple fistulas.

The disease is clinically featured by symptoms that resemble those of ulcerative colitis, namely, fever, diarrhea and emaciation, leading eventually to an obstruction of the small intestine; the constant occurrence of a mass in the right iliac fossa usually requires surgical intervention (resection). The terminal ileum is alone involved. The process begins abruptly at and involves the ileocecal valve in its maximal intensity, tapering off gradually as it ascends the ileum orally for from 8 to 12 inches (20 to 30 cm.). The familiar fistulas lead usually to segments of the colon, forming small tracts communicating with the lumen of the large intestine; occasionally the abdominal wall, anteriorly, is the site of one or more of these fistulous tracts.

The etiology of the process is unknown; it belongs in none of the categories of recognized granulomatous or accepted inflammatory groups. The course is relatively benign, all the patients who survive operation being alive and well.

---

From the Mount Sinai Hospital.

Read before the Section on Gastro-Enterology and Proctology at the Eighty-Third Annual Session of the American Medical Association, New Orleans, May 13, 1932.

Such, in essence, is the definition of a disease, the description of which is based on the study, to date, of fourteen cases. These cases have been carefully observed and studied in their clinical course; the pathologic details have resulted from a close inspection of resected specimens from thirteen of fourteen patients operated on by Dr. A. A. Berg.

### RELATIONSHIP OF REGIONAL ILEITIS TO OTHER BENIGN INTESTINAL PROCESSES

There exists in the medical literature a heterogenous group of benign intestinal lesions which have now and then been described under the caption of "benign granulomas." The latter loose term covers a multiplicity of conditions in which both large and small intestines may be involved; it includes all chronic inflammatory lesions of the intestine whose etiology is either unknown or attributable to an unusual physical agent. It represents a hodge-podge or melting-pot in which are thrown all those benign inflammatory intestinal tumors which are neither neoplastic nor due to a specific bacterial agent. Within this group one finds descriptions of foreign body tumors, chronic perforating lesions with gross inflammatory reactions, traumas of the mesentery with intestinal reactions, Hodgkin's granuloma, a late productive reaction to released strangulated hernias of the intestinal wall and numerous other and similar conditions. The so-called benign granulomas all present a tumor-like inflammatory mass which usually simulates carcinoma but which eventually unmasks itself as probably an infectious process of unknown causation. The multiplicity of the

Figure 11 : Première page de l'article écrit en 1932 par Crohn et collaborateurs décrivant la maladie de Crohn (Crohn *et al.*, 2000).

## II- La maladie de Crohn

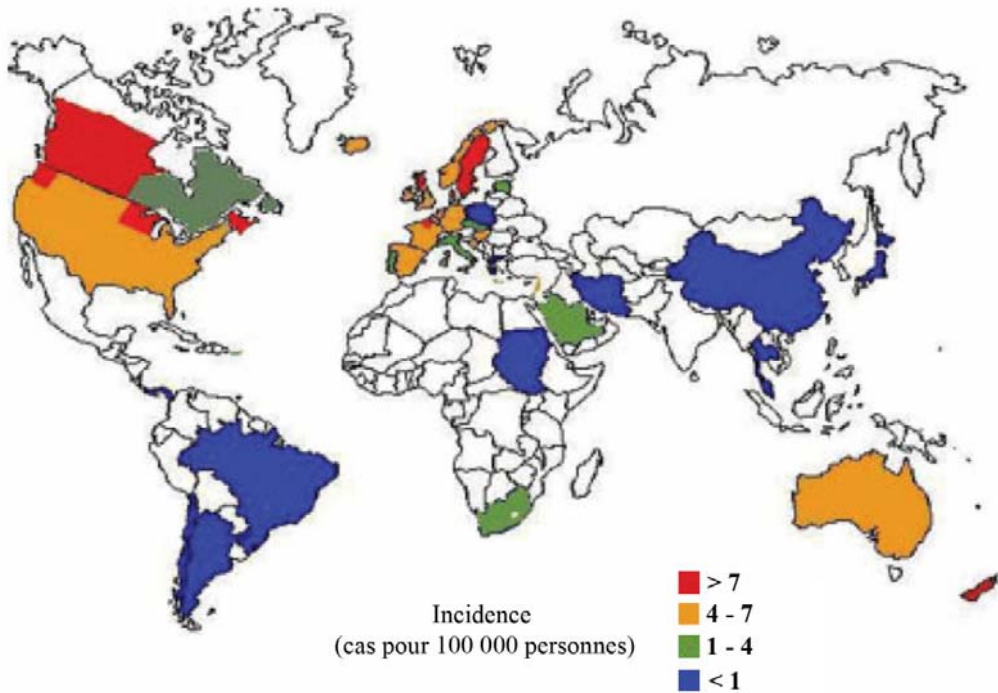
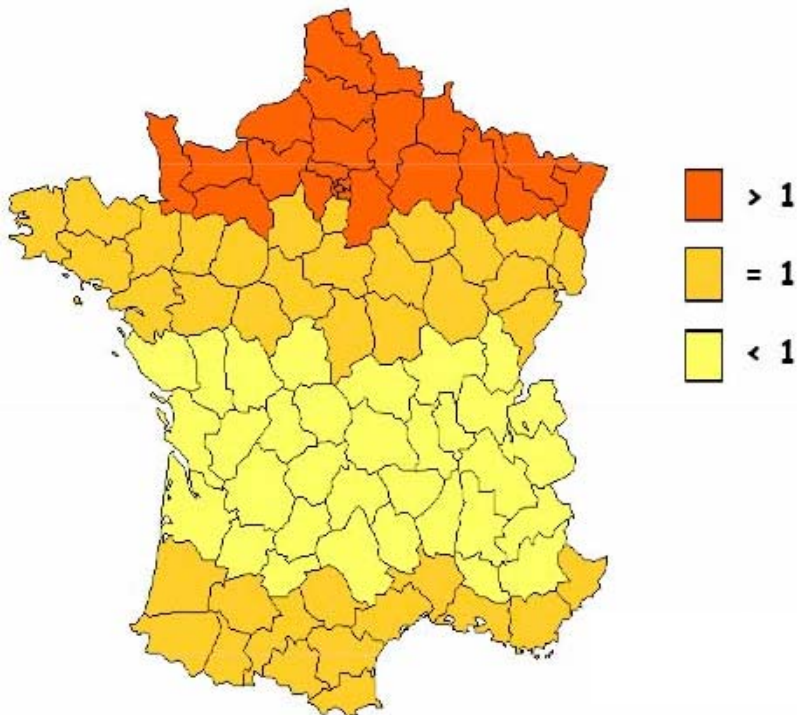
### II-1- Généralités

La maladie de Crohn (MC) fait partie, avec la rectocolite hémorragique (RCH), du groupe des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). En 1932, Burrill B. Crohn, médecin américain, donne son nom à la MC en décrivant 14 cas d'une affection appelée alors « Iléite Terminale ou Régionale » et localisée à la moitié terminale de l'iléon (**Figure 11**, Crohn *et al.*, 2000). B.B. Crohn et ses collaborateurs ont discerné l'originalité et la communauté des lésions tissulaires retrouvées chez ces 14 malades opérés. Par la suite, des anomalies tissulaires identiques ont également pu être observées en d'autres sites du tube digestif.

La MC est caractérisée par un état d'hyperactivation du système immunitaire de l'intestin, évoluant par poussées entrecoupées de périodes de rémission clinique de durées variables. Bien que tous les segments du tractus gastro-intestinal, de la bouche jusqu'à l'anus, puissent être affectés, les sièges préférentiels des lésions de la MC sont l'iléon terminal, le côlon et l'anus. Cette pathologie touche avec prédilection l'adulte jeune (15-30 ans) et a un fort retentissement sur la vie personnelle et professionnelle des malades en raison de la fréquence des poussées, des complications, et du recours parfois itératif à la chirurgie. A ce jour, il n'existe pas de traitement médical spécifique et susceptible de guérir définitivement la MC, mais seulement des traitements suspensifs ayant pour but de contrôler les poussées et d'éviter les récidives. Ses conséquences invalidantes, sa nature chronique et récidivante, et l'absence de traitement étiologique spécifique font de la MC un des problèmes majeurs de l'hépto-gastro-entérologie de nos jours.

#### II-1-1- Epidémiologie : prévalence et incidence

La prévalence des MICI a fortement augmenté au cours du siècle dernier. Cependant, la répartition des MICI dans le monde est très inégale : la MC et la RCH sont surtout fréquentes en Europe et en Amérique du Nord, alors qu'elles sont rares dans l'hémisphère Sud, à l'exception des populations blanches d'Australie, de Nouvelle-Zélande et d'Afrique du Sud (**Figure 12A**). L'incidence mondiale de la MC est évaluée entre 5 et 7 pour 100 000 habitants et, selon les régions du monde, l'incidence annuelle moyenne de la MC varie de 0,7

**A****B**

**Figure 12 : Incidence et répartition de la maladie de Crohn (MC) dans le monde et en France. A.** L'incidence de la MC est globalement plus élevée en Amérique du Nord et en Europe. Les pays en blanc correspondent à une absence de données (modifiée d'après Economou *et al.*, 2007). **B.** Le risque relatif de chaque département est comparé au risque national, défini comme 1 (Source EPIMAD).

à 14,6 pour 100 000 habitants (Binder, 2004; Farrokhyar *et al.*, 2001). Un gradient Nord-Sud de l'incidence de la MC est décrit aux Etats-Unis et en Europe (Shivananda *et al.*, 1996). En effet, l'incidence de la MC observée dans les pays situés au Nord de l'Europe (par exemple, Grande Bretagne : 11,1 et Suède : 8,9) est plus importante que celle enregistrée dans les pays du Sud de l'Europe (par exemple, Grèce : 0,9 et Italie : 2,3) (Economou *et al.*, 2007). En France, d'après les données du registre EPIMAD, l'incidence de la MC était de 5,1 en 1988 et de 5,9 en 1999 dans la région Nord-Pas-de-Calais, un gradient Nord-Sud étant également observé (**Figure 12B**). Le nombre de patients atteints de MC s'élèverait à 1 million de cas aux États-Unis et 1 million en Europe dont 120 000 cas en France.

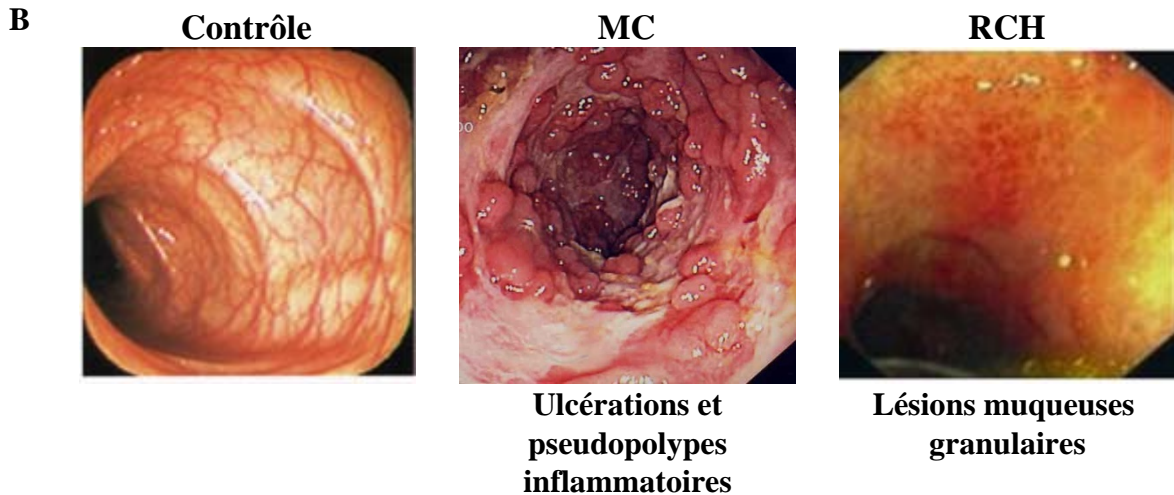
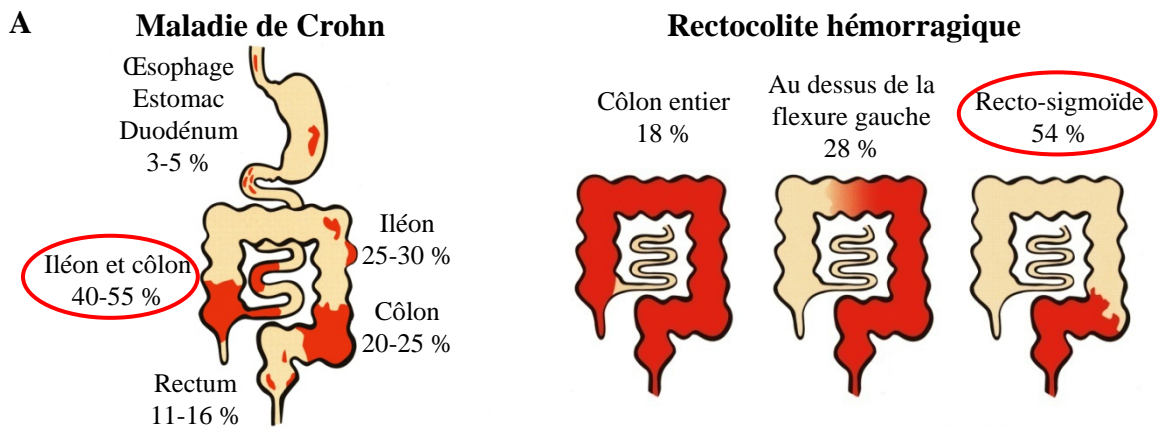
### II-1-2- Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques de la MC sont principalement d'ordre intestinal. La MC se manifeste par des douleurs abdominales très fréquentes au cours de poussées évolutives variables dans leur siège et leur intensité. La diarrhée constitue le second symptôme majeur de la MC. Une atteinte de l'anus ou de la région périanale est fréquente, provoquant diverses complications telles que des fistules, des fissures ou des abcès. Les poussées évolutives de la MC s'accompagnent d'une altération de l'état général des patients se traduisant par une asthénie, une anorexie, de la fièvre et une dénutrition. De plus, des manifestations inflammatoires extra-intestinales sont également observées au niveau articulaire, cutanéomuqueux, oculaire, hépato-biliaire et/ou urinaire chez 30 à 40% des patients atteints de MC (Juillerat *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2002). Les patients atteints de MC, et de pathologie de type MICI en général, présentent par rapport à la population normale un risque accru de développer un cancer colorectal, vraisemblablement lié à la chronicité de l'inflammation intestinale (Averboukh *et al.*, 2011; Rizzo *et al.*, 2011; Ullman and Itzkowitz, 2011).

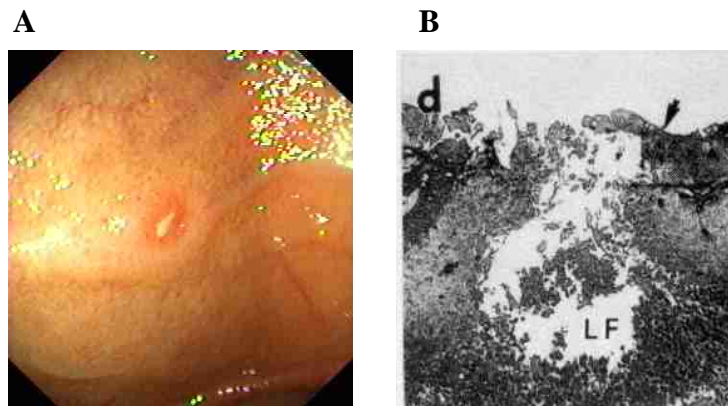
### II-1-3- Diagnostic clinique

Le diagnostic de la MC repose d'abord sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques, endoscopiques et histologiques. Cependant, il n'existe aucun test permettant d'affirmer à lui seul le diagnostic de la MC. En effet, l'absence d'éléments cliniques, biologiques, radiologiques, endoscopiques ou même histologiques spécifiques de la MC et la





**Figure 13 : Principales différences entre la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH).** A. La MC peut toucher la totalité du tube digestif, avec une localisation préférentielle au niveau de l'iléon terminal, alors que les lésions de la RCH se limitent au côlon et au rectum. B. L'endoscopie permet parfois de distinguer les lésions dites en «emporte-pièce» indiquant une MC, des lésions continues et granulaires caractéristiques de la RCH (d'après Inflammatory Bowel Disease, practice manual, 2004).



**Figure 14 : Ulcérations aphtoides précoces à la surface des plaques de Peyer observées lors des stades précoces de la maladie de Crohn.** A. Cliché d'endoscopie permettant de visualiser une lésion aphtoïde, stade très précoce des lésions intestinales chez les patients atteints de MC. B. L'observation microscopique des lésions aphtoides montre qu'elles apparaissent à la surface des plaques de Peyer (Fujimura *et al.*, 1996).

variabilité d'expression de la maladie rendent son diagnostic difficile. L'établissement de ce dernier nécessite d'exclure toutes les autres affections curables donnant un tableau clinique analogue (Nikolaus and Schreiber, 2007).

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

La MC et la RCH présentent des symptômes communs et leur diagnostic différentiel est important, puisqu'il s'agit de maladies distinctes pour lesquelles les stratégies thérapeutiques médicales ou chirurgicales seront différentes. La RCH se caractérise par l'inflammation continue du côlon évoluant par poussées et rémissions successives. Elle débute par le bas du rectum, s'étend d'un seul tenant vers le haut et peut toucher l'intégralité du côlon. En revanche, l'intestin grêle et l'anus ne sont jamais atteints (**Figure 13**). Dans la majorité des cas, le diagnostic différentiel entre la MC et la RCH nécessite la combinaison des examens endoscopiques et anatomo-pathologiques (**Tableau 1**) (Baumgart and Sandborn, 2007; Xavier and Podolsky, 2007). La distinction entre la MC et la RCH ne pose guère de difficulté, notamment lorsqu'il existe des atteintes ano-périnéales typiques de la MC. En revanche, la distinction entre RCH et MC à localisation limitée au rectum ou au côlon peut être difficile et le diagnostic peut rester, dans ce cas, indéterminé pendant de nombreuses années. Ainsi, les colites indéterminées regroupent l'ensemble des MICI ne permettant pas de faire la distinction entre MC et RCH. Elles représentent environ 10 à 12% des colites.

Les lésions de la MC sont plurisegmentaires, discontinues, respectant des intervalles de muqueuse saine, et touchent toute l'épaisseur de la paroi intestinale. La lésion la plus précoce est l'ulcération aphtoïde, conséquence d'une nécrose des cellules M localisées au niveau des plaques de Peyer (Fujimura *et al.*, 1996; Gullberg and Soderholm, 2006; Morson, 1972) (**Figure 14**). Suite à ces ulcérations aphtoïdes précoces apparaissent des ulcérations superficielles ou profondes et étendues. Les ulcérations peuvent également atteindre la sous-muqueuse, pouvant conduire à la formation de fistules et d'abcès. Au niveau microscopique, la lésion élémentaire est le granulome épithélioïde et géantocellulaire, présent dans 30 à 60 % des cas (Sura *et al.*, 2011). Il s'agit de nodules formés par l'agglomération d'histiocytes



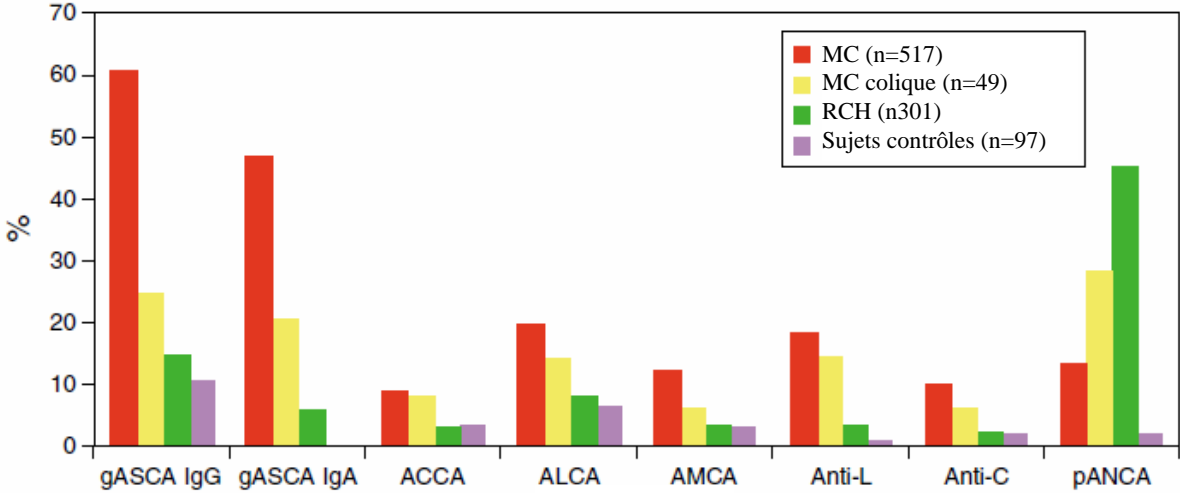
**Tableau 1 : Principaux critères endoscopiques, anatomo-pathologiques et sérologiques distinguant rectocolite hémorragique et maladie de Crohn** (d'après Joossens *et al.*, 2002; Lodes *et al.*, 2004; Morson, 1990; Mow *et al.*, 2004a; Quinton *et al.*, 1998; Stange *et al.*, 2005; Stange *et al.*, 2006; Targan *et al.*, 2005).

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

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

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

Phénotype	Nombre d'anticorps positifs					P value
	1 (n=103)	2 (n=130)	3 (n=77)	4 (n=38)	>5 (n=30)	
Age lors du diagnostic (année)	23,50	19,60	20,20	18,00	19,8	<b>0,0004</b>
MC pénétrante (%)	24,27	25,38	31,17	36,84	46,67	<b>&lt;0,0001</b>
Inflammation périanale (%)	21,36	28,46	24,68	36,84	53,33	<b>0,0005</b>
Inflammation iléocolique (%)	48,54	56,15	41,56	65,79	73,33	<b>0,0002</b>
Chirurgie abdominale (%)	51,64	54,62	63,64	57,89	76,67	<b>&lt;0,0001</b>



**Figure 15 : Prévalence des anticorps dirigés contre des résidus glycosylés chez les patients atteints de maladie de Crohn (MC), de rectocolite hémorragique (RCH), ou chez les patients contrôles.** (modifiée d'après Seow *et al.*, 2009). ASCA, anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody; ACCA , anti-chitobioside; ALCA, anti-laminaribioside; AMCA, anti-mannobioside; Anti-L, anti-laminarin; Anti-C, anti-chitin; ANCA, Deoxyribonuclease (DNase I)-sensitive perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody,

associés à quelques cellules géantes. Les granulomes sont le plus souvent localisés dans la sous-muqueuse ou la sous-séreuse.

#### II-1-4- Les marqueurs biologiques

La recherche de marqueurs sériques spécifiques à la MC présente un grand intérêt car ils apportent un bénéfice considérable quant au diagnostic non invasif de la MC (**Tableau 2**). De plus, ces marqueurs sériques permettent une amélioration des diagnostics précoces ainsi que le suivi de la progression de la maladie et de la réponse d'un patient à une thérapie. Une grande variété de marqueurs sériques ou sanguins ont été étudiés dans le but de définir un marqueur idéal pouvant permettre de suivre l'évolution de la maladie au cours du temps (Meuwis *et al.*, 2007). Cependant, aucun n'est spécifique ou assez sensible pour remplacer les diagnostics cliniques. Outre les marqueurs classiques de l'inflammation (protéine C réactive (CRP), haptoglobine, orosomucoïde, TNF- $\alpha$  et Interleukine-6), plusieurs marqueurs sérologiques ont été mis en évidence et permettent d'améliorer la fiabilité du diagnostic et la différenciation entre la MC et la RCH (Beaven and Abreu, 2004; Bossuyt, 2006; Joossens *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2003). Ils peuvent être classés en deux groupes : les anticorps dirigés contre des résidus sucrés et les anticorps dirigés contre un épitope bactérien :

##### II-1-4-1 Les anticorps dirigés contre des résidus sucrés

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

- les ASCA (pour Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies) sont des anticorps de type IgA ou IgG dirigés contre un résidu mannose retrouvé à la surface de la levure non pathogène *Saccharomyces cerevisiae* (Main *et al.*, 1988; Sendid *et al.*, 1996). La prévalence des ASCA est comprise entre 39 et 70% chez les patients atteints de MC, entre 5 et 15% chez



ceux atteints de RCH, et entre 0 et 5% chez les témoins (Bossuyt, 2006). Ces anticorps sont associés à un phénotype particulier de la MC, notamment à une maladie se déclarant tôt, à localisation iléale, souvent compliquée par des sténoses ou des fistules (Forcione *et al.*, 2004; Mow *et al.*, 2004b). En dehors de leur rôle diagnostique et de classification phénotypique des patients, les raisons de l'existence des ASCA chez les patients atteints de MC ne sont pas clairement identifiées. Leur présence pourrait refléter soit une diminution de la tolérance immunologique au niveau de la lumière intestinale vis-à-vis d'antigènes spécifiques de levures endogènes (*Candida albicans*) ou alimentaires (*S. cerevisiae*), soit une réponse immune spécifique vis-à-vis de pathogènes non identifiés qui possèderaient des épitopes réagissant de façon croisée avec les phosphopeptidomannanes de levures reconnus par les ASCA (Beaven and Abreu, 2004; Konrad *et al.*, 2004; Standaert-Vitse *et al.*, 2006).

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

#### II-1-4-2 Les anticorps dirigés contre un épitope bactérien

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

- les anticorps anti-séquence I2. Cette séquence microbienne I2, associée à *Pseudomonas fluorescens*, a été identifiée comme un homologue de la famille des facteurs de transcription TetR. Des anticorps anti-I2 sont retrouvés chez 54% des patients atteints de MC principalement au niveau des lésions coliques, 10% de RCH, 19% des patients atteints d'autres pathologies inflammatoires de l'intestin, et chez 4% des individus sains (Sutton *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2002). Ces anticorps anti-I2 sont associés à des maladies sténosantes, nécessitant un recours précoce à la chirurgie (Mow *et al.*, 2004b; Spivak *et al.*, 2006).

- les anticorps anti-flagelline CBir1 qui sont dirigés contre la sous-unité majeure de structure des flagelles bactériens. La flagelline CBir1 a été identifiée comme un antigène déterminant, capable d'induire des colites chez des souris C3H/HeJBir. Chez l'homme, des





taux importants d'IgG anti-CBir1 ont été retrouvés chez environ 50% des patients atteints de MC (Lodes *et al.*, 2004). L'expression de ces anticorps semble être indépendante des autres marqueurs déjà décrits, et correspond à un sous groupe de patients particulier (Papadakis *et al.*, 2007; Targan *et al.*, 2005).

#### II-1-5- Stratégies thérapeutiques

Aucun traitement n'est actuellement en mesure de guérir définitivement la MC. Les traitements de la MC utilisés actuellement ont pour objectif le contrôle rapide des poussées et la prévention des récurrences grâce aux anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que les dérivés salicylés (salazosulfasalazine (Salazopyrine®), olsalazine (Dipentum®) et mésalazine (Pentasa®, Rowasa®)), aux corticoïdes (Cortancyl®, Solupred®) et aux immunosuppresseurs (azathioprine (Imurel®), méthotrexate). Ces thérapies sont caractérisées par un délai d'action, des taux de réponses incomplets et un risque substantiel d'effets secondaires.

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

L'utilisation de thérapies plus ciblées basées sur des anticorps monoclonaux anti-TNF- $\alpha$ , tels que l'Infliximab (Rémicade®), l'Adalimumab (Humira®), et le certolizumab pegol (Cymzia®), s'avère une stratégie d'immunomodulation efficace chez les patients ayant une atteinte très sévère de MC et ne répondant pas aux traitements cliniques conventionnels (Keating and Perry, 2002; Sandborn and Hanauer, 2002; Sandborn *et al.*, 2007). Le TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire qui exerce un rôle majeur dans le processus inflammatoire en général et au cours de la MC en particulier (pour revue, (Gross *et al.*, 1991). En effet, les quantités importantes de cette cytokine retrouvées au niveau de la muqueuse intestinale et des selles de patients atteints de MC sont associées à la présence de granulomes, et ont un rôle central dans la stimulation et l'expansion clonale des lymphocytes T (Breese *et al.*, 1994; Nicholls *et al.*, 1993). L'utilisation de cet anticorps s'est révélée efficace, permettant un contrôle des poussées et un maintien des rémissions de MC (D'Haens *et al.*, 1999; Present, 1999; Rutgeerts and Baert, 1999; Rutgeerts *et al.*, 1999; Sandborn *et al.*, 2002). De plus, ils peuvent être utilisés en combinaison avec les immunosuppresseurs tels que l'azathioprine

**Tableau 3 : Stratégies et cibles pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.** Les cibles sont indiquées en italique (d'après Kucharzik *et al.*, 2006).

Effets sur l'organisme	Stratégies ou cibles
Anti-inflammatoires et immunosuppresseurs	aminosalicylés corticostéroïdes
Immunomodulation, inhibition des voies de signalisation	azathioprine, anti-TNF- $\alpha$ , anti-IFN- $\gamma$ , IL-10 <i>MAP Kinase/JNK, NF-<math>\kappa</math>B/IKK<math>\beta</math>, T-bet, c-maf, EN-RAGE/RAGE</i> alpha-MSH/ <i>MC1R</i> , lipoxines
Élimination du processus de présentation de l'antigène	antibiotiques probiotiques ( <i>E. coli</i> Nissle, VSL) helminthes anti-TLR/ <i>TLR</i> TLR9/IFN de type I
Inhibition de l'activation des lymphocytes T CD4+ et de la reconnaissance de l'antigène	AZA/6MP, CyA, tacrolimus MTX, anti-CD3, CEACAM1
Induction de l'apoptose	thalidomide anti-TNF/ <i>TNF murin</i> <i>Il-6/sIL-6, Flip, Rac-1</i>
Génération de lymphocytes T régulateurs et activation de lymphocytes T effecteurs	anti-IL-12, anti-TNF IL-10
Inhibition du recrutement, de la migration	<i>ICAM-1, Intégrine 4, Intégrine <math>\alpha</math>4<math>\beta</math>7, CCR9</i>
Inhibition de l'activation du GALT	<i>LT<math>\beta</math>/récepteur LT<math>\beta</math>, CCR6</i>
Réparation et reconstitution de la fonction de barrière	GM-CSF, KGF-2, EGF facteur trefoil bactérien hormone humaine de croissance défensines, cathélicidines <i>JAM, CAR, IL-13</i>

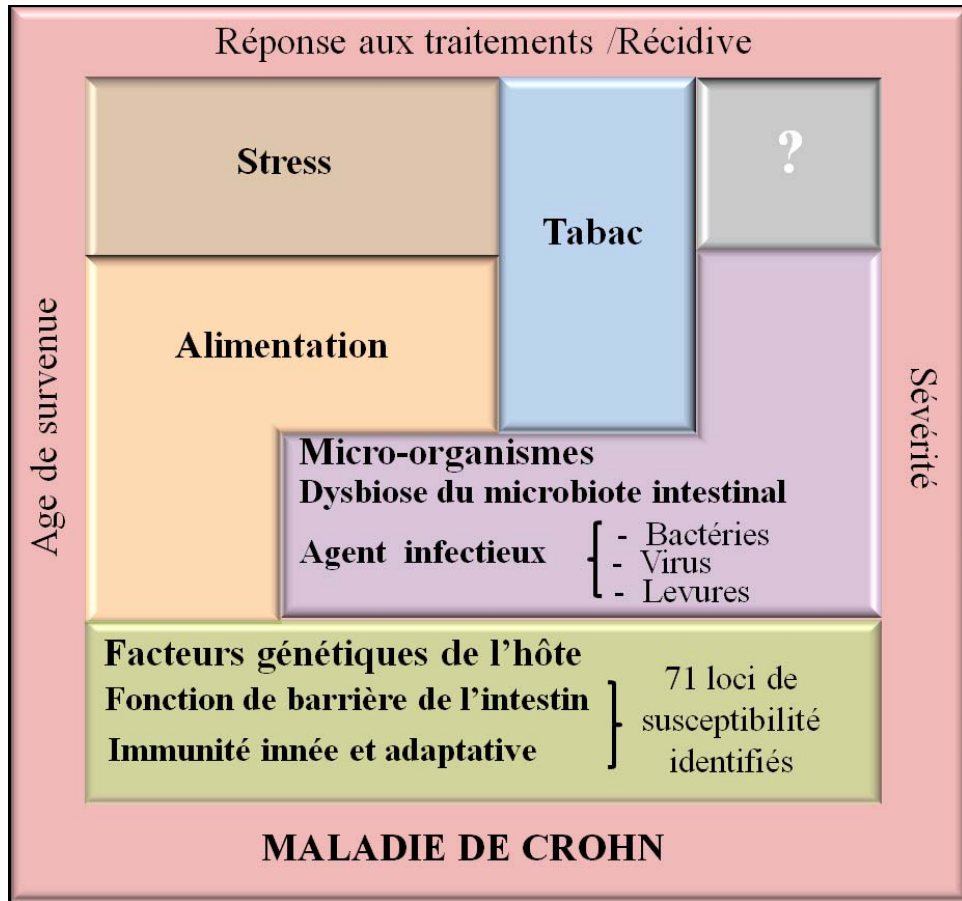
pour une meilleure réponse thérapeutique (Colombel *et al.*, 2010). Toutefois, ce traitement présente des limites puisque les patients traités avec l'Infliximab produisent parfois des anticorps anti-Infliximab, diminuant la durée de réponse au traitement (Baert *et al.*, 2003). De plus, l'utilisation de l'Infliximab chez les patients atteints de MC est associée à une augmentation du risque d'infections, notamment au niveau des voies respiratoires et urinaires, ainsi qu'à une augmentation du risque de réactivation de tuberculose latente (Hommes *et al.*, 2006).

Des anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines de la famille des intégrines, en particulier l'intégrine  $\alpha 4$ , donnent également des résultats prometteurs (Natalizumab, Cottone *et al.*, 2010). Ils agiraient en empêchant la transmigration des cellules immunitaires circulantes à travers l'endothélium vasculaire.

L'ensemble des travaux des dix dernières années sur la MC et la RCH laisse supposer que la pathogenèse des MICI repose sur la combinaison d'une susceptibilité génétique, d'une réponse immunitaire anormale, d'un dysfonctionnement de la barrière intestinale et de l'implication de la flore microbienne intestinale. Ces données ont donc stimulé la recherche et le développement de stratégies thérapeutiques nouvelles, alternatives à la chirurgie et à la corticothérapie, telles que l'utilisation d'antibiotiques, de probiotiques ou d'agents modulant la réponse inflammatoire (**Tableau 3**, Kucharzik *et al.*, 2006).

La thérapie probiotique est une autre approche thérapeutique alternative dans la prévention de rechute chez les patients atteints de MC. Plusieurs microorganismes tels que *E. coli* Nissle 1917, *Lactobacillus* GG et *Saccharomyces boulardii* ont été testés. Cependant, à l'heure actuelle, aucune étude n'a permis de mettre en évidence que ces préparations probiotiques apportent des résultats satisfaisants, et l'utilisation de probiotiques dans le traitement de la MC reste discutée (pour revue, Prantera and Scribano, 2009).

Une thérapie antibiotique peut permettre de diminuer le nombre de bactéries associées à la muqueuse, voire de supprimer les bactéries qui sont responsables des lésions histologiques primaires et de réduire le taux de translocation bactérienne. Des antibiotiques à large spectre sont fréquemment utilisés avec succès dans le traitement de la MC (Khan *et al.*, 2011). Parmi les antibiotiques utilisés, le métronidazole a été très étudié. Cet antibiotique est actif contre les bactéries anaérobies strictes et a été testé en monothérapie, surtout pour les MC coliques et iléocoliques (Ambrose *et al.*, 1985; Blichfeldt *et al.*, 1978; Colombel *et al.*, 2001; Ursing *et al.*, 1982). Cependant, ce traitement présente de nombreux effets secondaires pouvant limiter son utilisation. La ciprofloxacine est également un des traitements potentiels de MC actives, et est aussi efficace en combinaison avec des traitements standards chez les



**Figure 16 : Etiologie multifactorielle de la maladie de Crohn.** La MC résulte de la combinaison de différents composants : facteurs génétiques, environnementaux (tabac, stress, alimentation) et infectieux (micro-organismes commensaux ou pathogènes). L'implication d'autres facteurs encore non identifiés (?) n'est pas à exclure. L'ensemble de ces facteurs agirait sur l'âge de la survenue de la MC, sa sévérité, la réponse aux traitements et les récurrences de la maladie.

patients présentant une certaine résistance (Arnold *et al.*, 2002; Colombel *et al.*, 1999). La combinaison de ciprofloxacine avec la métronidazole peut être un traitement alternatif aux stéroïdes dans les phases aiguës de MC (Prantera *et al.*, 1996; Steinhart *et al.*, 2002). Cette combinaison est aussi utilisée pour le traitement des manifestations périanales de la MC (Schwartz *et al.*, 2001). Il faut noter que la ciprofloxacine est un antibiotique à tropisme intracellulaire et permet donc de cibler les bactéries invasives (Subramanian *et al.*, 2008).

Des études cliniques ayant pour objectif d'étudier l'impact éventuel de la rifaximine ont montré que cet antibiotique induisait des rémissions cliniques chez 52% des patients atteints de maladie de Crohn, contre seulement 33% chez le groupe placebo (Prantera *et al.*, 2006).

## II-2- Facteurs étiologiques de la maladie de Crohn

L'étiologie précise de la MC, encore mal connue à ce jour, est multifactorielle. Les études cliniques et épidémiologiques mettent en évidence l'implication de facteurs environnementaux, de facteurs génétiques et de facteurs infectieux entraînant une hyperactivation du système immunitaire intestinal. Les interactions entre ces multiples facteurs restent encore mal connues, mais elles aboutissent à une réponse inflammatoire non contrôlée à l'origine de la survenue, du maintien et/ou de l'aggravation de la MC (**Figure 16**).

### II-2-1- Facteurs environnementaux

Les arguments en faveur de l'intervention de facteurs environnementaux dans le développement de la MC sont basés sur plusieurs observations telles que : (i) la très forte augmentation de l'incidence de cette maladie dans les pays industrialisés depuis 50 ans et dans les pays en voie de développement (Lerebours *et al.*, 2003); (ii) la répartition hétérogène de la MC dans le monde et les taux d'incidence géographique se déclinant selon un gradient Nord-Sud (Declercq *et al.*, 2010); (iii) les différences d'incidence constatées dans certaines populations migrantes, avec par exemple l'augmentation du nombre de MICI pour les populations asiatiques migrant en Europe et inversement la diminution du risque de MICI chez les populations européennes migrant en Asie (Yang *et al.*, 2001); (iv) l'absence de concordance parfaite de MC chez les jumeaux monozygotiques. Selon les études, le

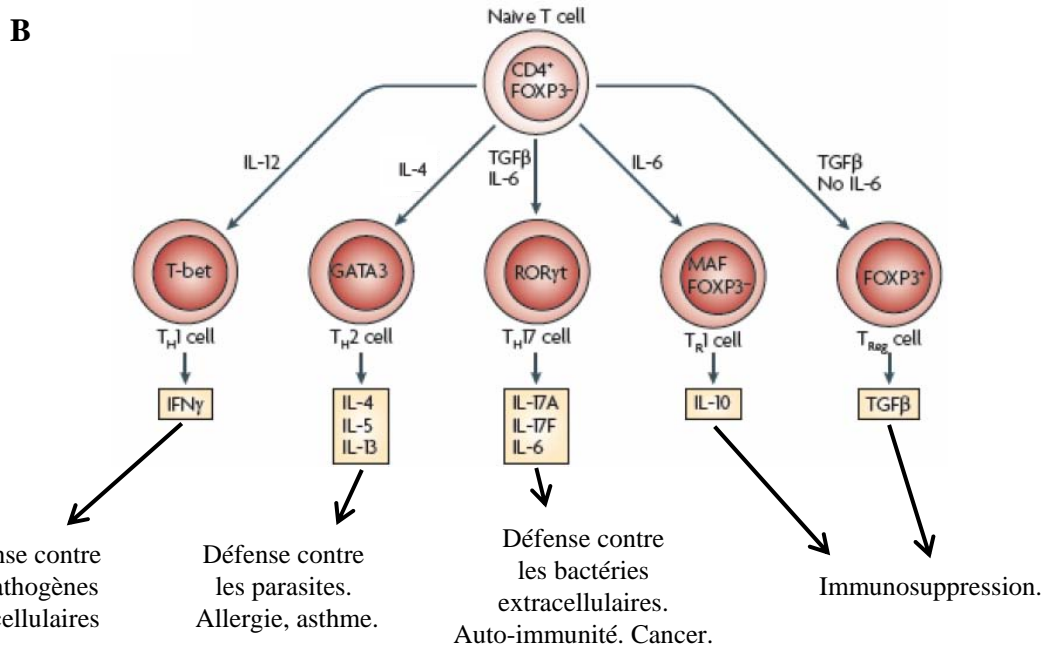
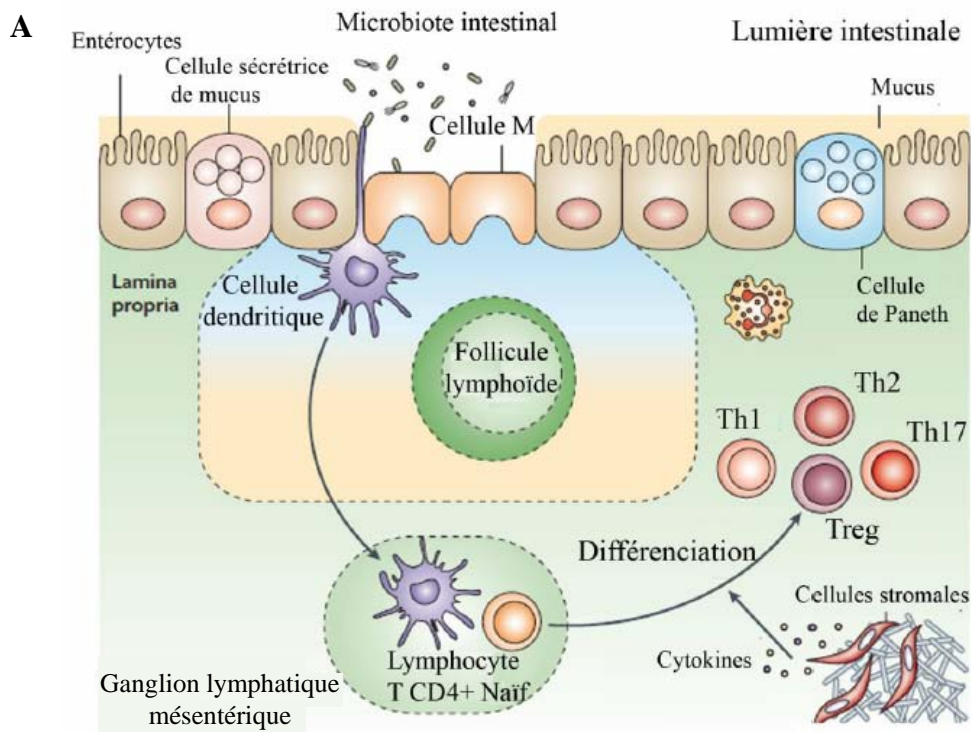


pourcentage de jumeaux monozygotes où les 2 individus sont atteints oscille de 20 à 50% contre seulement 4 à 7 % pour des jumeaux dizygotes (Halfvarson *et al.*, 2003; Orholm *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 1996), indiquant que le déterminisme n'est pas que génétique.

Depuis 1984, de nombreuses études ont observé une association entre tabagisme actif et MC, avec une aggravation de l'évolution de la maladie surtout chez les femmes (Birrenbach and Bocker, 2004; Cosnes, 2004). Le risque de poussée de MC est augmenté de 50% chez les fumeurs, qui développent davantage de complications perforantes sévères de type abcès ou fistules (Cottone *et al.*, 1994). Les mécanismes des effets du tabagisme restent obscurs, mais le tabac affecte à la fois l'immunité des muqueuses et l'immunité systémique, altérant les fonctions de l'immunité innée et adaptative. Par exemple, des macrophages isolés de fumeurs présentent une activité bactéricide réduite lors d'infection à *Listeria monocytogenes* (King *et al.*, 1988). De plus, le tabac augmente la perméabilité intestinale ainsi que la production de mucus au niveau du côlon (Cosnes, 2004).

D'autres facteurs environnementaux sont également évoqués dans la survenue de la MC, sans qu'il soit possible d'établir de réels liens de cause à effet. Tout d'abord, des études épidémiologiques ont suggéré que les fruits et les légumes joueraient un rôle protecteur alors que la consommation d'aliments de type « fast-food » ou de sucres raffinés serait un facteur de risque de MC (Matsui *et al.*, 1990; Persson *et al.*, 1992; Reif *et al.*, 1997; Russel *et al.*, 1998; Seibold, 2005; Suzuki *et al.*, 2008). Par ailleurs, les émulsifiants de plus en plus présents dans nos aliments, ainsi que les traces de détergents (liquide vaisselle) présents sur nos couverts pourraient contribuer à réduire l'épaisseur de la couche de mucus intestinal, et favoriser de ce fait la colonisation de la muqueuse intestinale par des bactéries pouvant induire une inflammation chronique (Swidsinski *et al.*, 2009). Enfin, l'aluminium, que l'on trouve fréquemment au contact des aliments et sous forme de microparticules dans l'environnement, est une autre hypothèse attractive (Lerner, 2007). Il pourrait induire une réponse inflammatoire anormale lors de son adsorption sur des nutriments ou des bactéries de la lumière intestinale.





**Figure 17 : Différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et profil d'expression de cytokines. A.** Au niveau intestinal, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs sont situés au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques. Les cellules dendritiques associées à l'épithélium intestinal, en particulier au niveau des cellules M des plaques de Peyer et des follicules lymphoïdes, ont une forte activité d'endocytose et vont permettre la production et la présentation d'antigènes échantillonnés à partir du contenu luminal (bactéries par exemple). Elles migrent ensuite au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques et participent à la différenciation des T CD4<sup>+</sup> naïfs. Ces derniers migrent alors dans la lamina propria. **B.** Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> finissent de se différencier en fonction de l'environnement cytokinique. Chaque sous-population (Th1, Th2, Th17, Tr1 et Treg) sécrète un profil de cytokines caractéristique. (GATA3, GATA-binding protein 3; MAF, macrophage-activating factor; ROR $\gamma$ t, retinoic acid receptor-related orphan receptor- $\gamma$ t; TGF $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ) (modifiée d'après Cho, 2008 et Hooper *et al.*, 2010).

## II-2-2- Facteurs immunitaires

La MC est caractérisée par un état d'hyperactivation du système immunitaire qui pourrait être la conséquence d'une dérégulation de la réponse immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale de l'hôte.

En réponse à une stimulation bactérienne, l'activation de l'immunité innée fait intervenir différents récepteurs activés par des bactéries ou des produits bactériens. Il s'agit des récepteurs cytoplasmiques NOD (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain*) et des récepteurs membranaires TLR (*Toll-Like Receptor*). Les caractéristiques et l'implication de ces deux types de récepteurs dans le développement de la MC seront développées ultérieurement dans les chapitres II-2-3-1 et II-2-3-5.

L'inflammation intestinale se traduit par un recrutement et une activation des lymphocytes et des macrophages, mais également par une infiltration de cellules polynucléaires neutrophiles, d'éosinophiles, de monocytes et de mastocytes. La libération consécutive de cytokines solubles et d'autres médiateurs de l'inflammation conduit à l'amplification de la réponse immunitaire locale, responsable des lésions tissulaires. Les cytokines proinflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- $\alpha$  sont libérées en grande quantité dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MC (Desreumaux *et al.*, 1997; Niessner and Volk, 1995). Cette production accrue de cytokines proinflammatoires est une conséquence directe de l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappa B) chez les patients atteints de MC (Ellis *et al.*, 1998; Schreiber *et al.*, 1998).

Les cytokines inflammatoires joueraient un rôle clé dans l'induction et la chronicité de l'inflammation intestinale chez les patients atteints de MC. En effet, selon l'environnement cytokinique dans lequel se trouvent les lymphocytes T naïfs lors de leur activation, une même cellule précurseur peut se polariser vers le phénotype Th1, Th17 ou Th2 (**Figure 17A**).

L'IL-12 est la cytokine essentielle dans le développement de la réponse **Th1**, principalement produite par les macrophages et les cellules dendritiques après stimulation par divers adjuvants ou par des antigènes bactériens tels que le LPS (**Figure 17B**) (Hsieh *et al.*, 1993). La signalisation du récepteur à l'IL-12 active la voie STAT-3 et STAT-4 (Signal Transducers and Activators of Transcription) (Jacobson *et al.*, 1995) aboutissant à l'expression du facteur de transcription T-bet caractéristique des lymphocytes Th1 et à la production d'IFN- $\gamma$ .

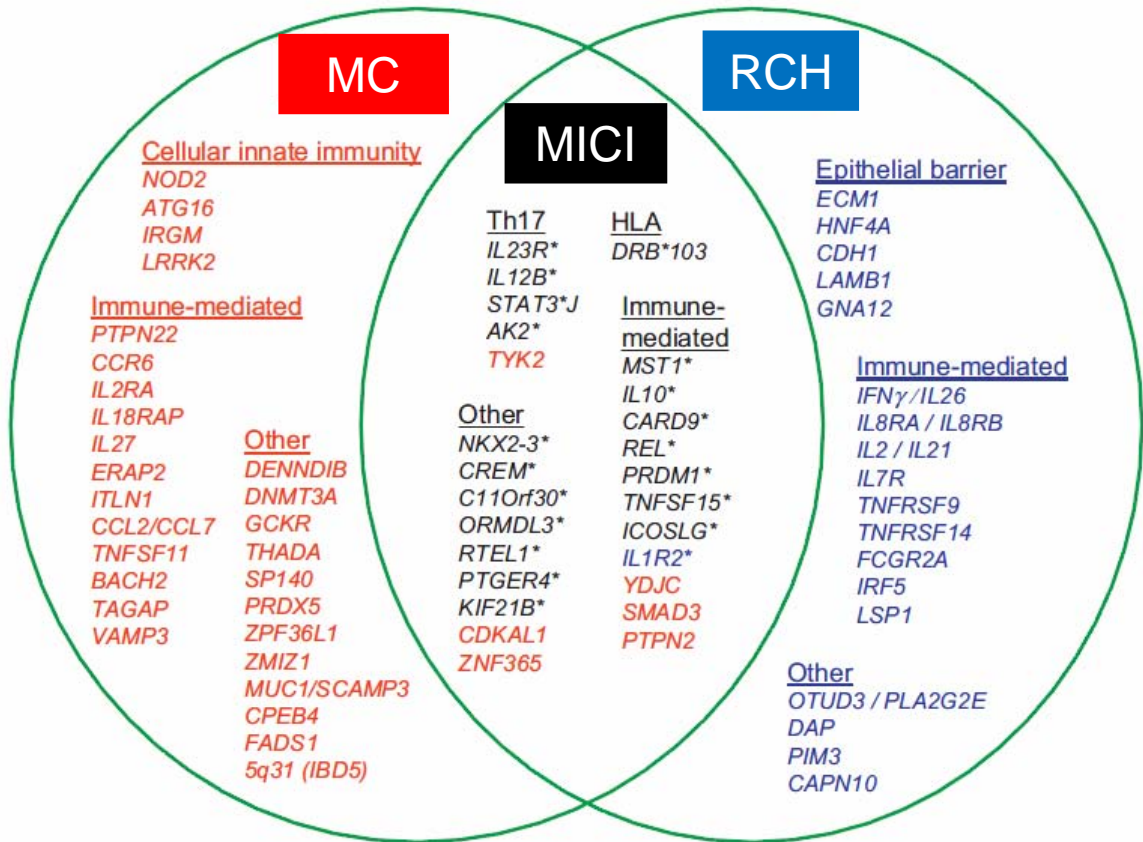


L'IL-6, le TGF- $\beta$  et l'IL-23 sont indispensables à la différenciation et au maintien du phénotype **Th17** (Colgan and Rothman, 2006; Ivanov *et al.*, 2006; Iwakura and Ishigame, 2006). Les lymphocytes Th17 produisent des cytokines pro-inflammatoires IL-17A, IL-17F, IL-6 et TNF- $\alpha$  (Colgan and Rothman, 2006). Il a été montré que le récepteur nucléaire ROR- $\gamma$ T est le facteur de transcription qui orchestre la différenciation vers le lignage Th17 (Colgan and Rothman, 2006; Ivanov *et al.*, 2006). Chez les patients atteints de MC, l'importance d'une réponse de type Th17 dans le développement de la maladie a été décrite (Strober and Fuss, 2011). Il a notamment été observé des taux anormalement élevés d'IL-17 au niveau de la muqueuse intestinale ainsi que dans le sérum des patients atteints de MC (Fujino *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2008; Nielsen *et al.*, 2003).

En raison du rôle avéré des cytokines TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 durant la phase chronique de la pathologie, la MC est considérée comme une pathologie de type Th1/Th17. Cependant, il a été montré que les lésions précoces de la maladie sont associées à une augmentation de la production d'IL-4 (Desreumaux *et al.*, 1997), cytokine entraînant l'activation du facteur de transcription GATA-3 (Ouyang *et al.*, 2000) et indispensable à l'engagement dans la voie de différenciation **Th2** (Seder, 1994).

### II-2-3- Facteurs génétiques

L'hypothèse d'une prédisposition génétique à la MC repose sur plusieurs arguments (pour revue, Cho and Brant, 2011). Tout d'abord, des différences d'incidence de la MC sont observées entre certains groupes ethniques. (Kurata *et al.*, 1992; Roth *et al.*, 1989a; Roth *et al.*, 1989b). Par ailleurs, les études épidémiologiques indiquent que le risque de développer une MC lorsqu'un parent du premier degré est atteint est 10 à 21 fois plus élevé que dans la population générale, et la fréquence de formes familiales de MC peut atteindre 40% (Binder and Orholm, 1996; Colombel and Hugot, 1996; Monsen *et al.*, 1991; Orholm *et al.*, 1991), pour revue (Halme *et al.*, 2006). Toutefois, ces agrégations ethniques ou familiales peuvent aussi être en rapport avec un facteur de prédisposition environnemental partagé par tous les membres d'une même communauté. Il est impossible de trancher formellement entre l'hypothèse d'un facteur environnemental ou l'hypothèse d'un facteur génétique (qui ne s'exclue d'ailleurs nullement) sans analyse faisant appel à l'épidémiologie génétique. Ainsi, le principal argument en faveur d'une prédisposition génétique est apporté par les études chez



**Figure 18 : Facteurs génétiques dans l'étiologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).** Les gènes de susceptibilités associés à la maladie de Crohn (MC) sont représentés en rouge, et ceux associés à la rectocolite hémorragique (RCH) en bleu (modifiée d'après Lees *et al.*, 2010).

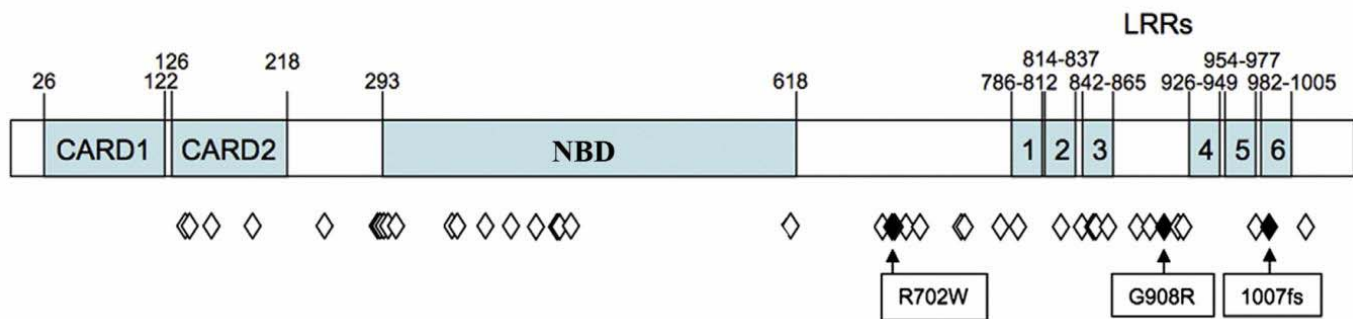
les jumeaux montrant que la concordance de la MC est d'environ 40 % chez les jumeaux monozygotiques alors qu'elle est pratiquement nulle chez les jumeaux dizygotiques (Halfvarson *et al.*, 2003; Orholm *et al.*, 2000; Tysk *et al.*, 1988), pour revue (Halme *et al.*, 2006).

La génétique inverse utilisant des marqueurs génétiques de polymorphisme dont la localisation est connue sur le génome, et puis plus récemment les études d'association à l'échelle du génome (GWA, *Genome-Wide Association*), ont permis l'exploration de la composante génétique des maladies multifactorielles, en particulier la MC, avec l'identification de plus de 70 loci indépendants (Barrett *et al.*, 2008; Cho and Brant, 2011; Hampe *et al.*, 2007; Lees *et al.*, 2010; Parkes *et al.*, 2007; Rioux *et al.*, 2007; Wellcome, 2007) (**Figure 18**).

Ces études ont mettent en évidence des polymorphismes (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) associés à un risque accru de MC qui peuvent être situés dans un gène bien défini ou dans une région inter-génique. Une partie de ces SNP se trouvent dans des séquences codantes de gène et peuvent conduire à l'expression d'une protéine variée (SNP non synonyme), certains autres sont des SNP silencieux ne modifiant pas la séquence de la protéine exprimée (SNP synonyme), d'autres encore peuvent se situer dans les séquences non codantes des gènes (intron, région 3' et 5' non traduites des ARN messagers). Les gènes de susceptibilité identifiés ont permis de mettre en lumière des processus cellulaires qui semblent jouer un rôle clé dans l'étiologie de la MC : l'immunité innée avec la prise en charge de micro-organismes (autophagie, récepteur NOD et TLR, stress du réticulum endoplasmique (RE) et l'immunité adaptative avec l'établissement de la réponse lymphocytaire T (Voie Th17). Les gènes les plus étudiés à ce jour sont ceux codant les protéines NOD2, TLR, ATG16L1, IRGM, et l'IL-23R. Dans le chapitre suivant seront détaillées les susceptibilités génétiques ayant un rapport avec la tolérance et la prise en charge des bactéries extracellulaires ou intracellulaires.

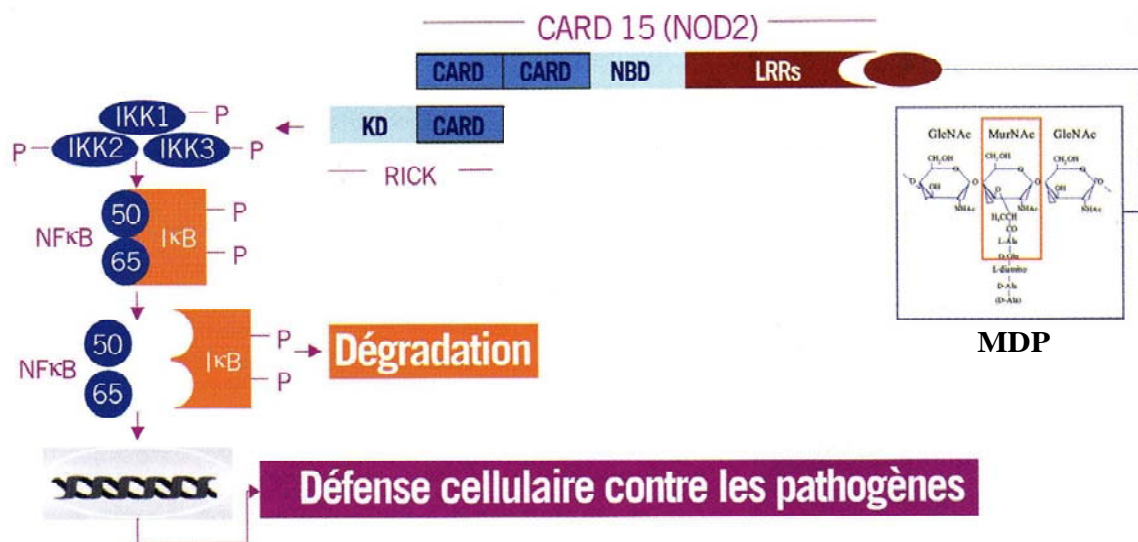
### II-2-3-1- *NOD2/CARD15*

En 2001, deux études ont permis d'établir le premier lien entre la MC et la présence de polymorphismes au niveau du gène *NOD2/CARD15* (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2/Caspase-Activating Recruitment Domain 15*) (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001). *NOD2* code pour un récepteur cytoplasmique de l'immunité innée exprimé



**Figure 19 : Structure du récepteur intra-cytoplasmique NOD2/CARD15.** Le récepteur cytoplasmique NOD2/CARD15 contient deux domaines de recrutement et d'activation des caspases situés en N-terminal (CARD, Caspase Activating Recruitment Domain), liés à un domaine de liaison aux nucléotides (NBD, Nucleotide-Binding Domain) et un domaine C-terminal composé de motifs répétés riches en leucines (LRR, Leucin-Rich Repeats). Les losanges noirs indiquent la localisation des 3 principales polymorphismes de la protéine associés à la MC. Les losanges blancs indiquent d'autres polymorphismes associés à la MC, mais moins fréquemment retrouvés (d'après Borzutzky *et al.*, 2010).

## Membrane



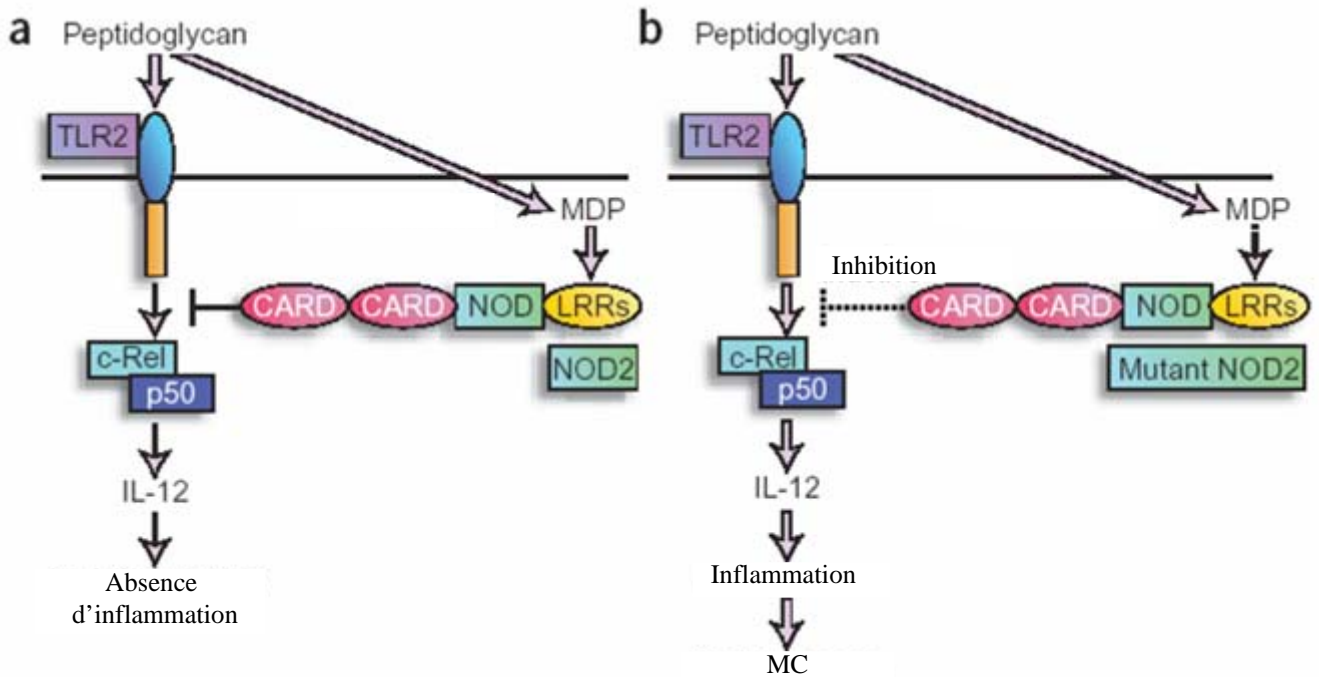
**Figure 20 : Fonction de NOD2/CARD15 dans l'activation de la voie NF-κB.** Le MDP, composé bioactif du peptidoglycane bactérien, interagit directement avec le domaine LRR de NOD2/CARD15. Cette liaison résulte en l'oligomérisation de NOD2/CARD15 et le recrutement de la kinase RICK/RIP2 via une interaction homotypique CARD-CARD. RIP2/RICK active ensuite le complexe IKK, conduisant à la phosphorylation de IκB. IκB est alors ubiquitiné puis dégradé par le protéasome, libérant ainsi le facteur de transcription NF-κB qui pourra être transloqué dans le noyau. Ceci va conduire à l'activation de la transcription de gènes codant notamment des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et de gènes codant des cryptidines et des α-défensines par les cellules de Paneth.

essentiellement dans les cellules de Paneth et les cellules immunitaires telles que les macrophages. Son expression dans les cellules épithéliales intestinales normales est quasiment nulle mais elle peut être induite suite à une stimulation par des composants bactériens, comme montré *in vitro* (Begue *et al.*, 2006). Chez les patients atteints de MC, de nombreux polymorphismes dans le gène *NOD2* ont été mis en évidence dont trois principaux qui représentent plus de 80% des variants rencontrés dans la population caucasienne associée à la MC, et qui conduisent à la production de protéines *NOD2* variantes (R702W, G908R et L1007fsinsC) (Begue *et al.*, 2006; Borzutzky *et al.*, 2010; Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001) (**Figure 19**). Il a été estimé que le risque de développer une MC est 1,5 à 3 fois supérieur chez les sujets hétérozygotes, et environ 40 fois supérieur chez les sujets homozygotes pour un allèle à risque ou hétérozygotes composites (deux allèles à risque différents) par rapport à des sujets n'ayant pas ces polymorphismes, ce qui représente le facteur de risque le plus important de MC connu à ce jour. Ces polymorphismes sont généralement associés à un développement de MC plus précoce, à localisation iléale et d'évolution plutôt sténosante (Barrett *et al.*, 2008; Bouma and Strober, 2003).

Le récepteur *NOD2* est constitué en N-terminal de deux domaines CARD (**Figure 20**), d'un domaine central NBD (*Nucleotide-binding domain*) et d'un domaine C-terminal composé de motifs répétés riches en leucine (*Leucine-reach repeat*, LRR). Ce domaine LRR est impliqué dans la reconnaissance du muramyl di-peptide (MDP) bactérien (Girardin *et al.*, 2003b). La fixation de ce ligand induit un changement de conformation du récepteur, lui permettant de recruter la kinase RIP2, conduisant à l'activation des voies de signalisation NF- $\kappa$ B et des MAP-kinases régulant la transcription de gènes cibles qui codent entre autre de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et des peptides antimicrobiens (Girardin *et al.*, 2003a; Philpott and Viala, 2004).

Les trois principaux polymorphismes du gène *NOD2* associé à la MC sont situés au niveau du domaine de fixation du ligand LRR, et des études *in vitro* ont montré une diminution de l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B par ces 3 protéines *NOD2* variantes comparativement à la protéine sauvage suite à une stimulation par du MDP (Girardin *et al.*, 2003b). Ces données pourraient paraître paradoxales puisqu'une augmentation de l'activité NF- $\kappa$ B est mesurée dans les biopsies coliques de patients atteints de MC (Schreiber *et al.*, 1998). De plus, des souris transgéniques « knock-in » (2939insC), mimant le variant humain produisant une protéine *NOD2* tronquée de ses 33 derniers acides aminés (L1007fsinsC) présentent une plus grande susceptibilité à l'induction d'une colite





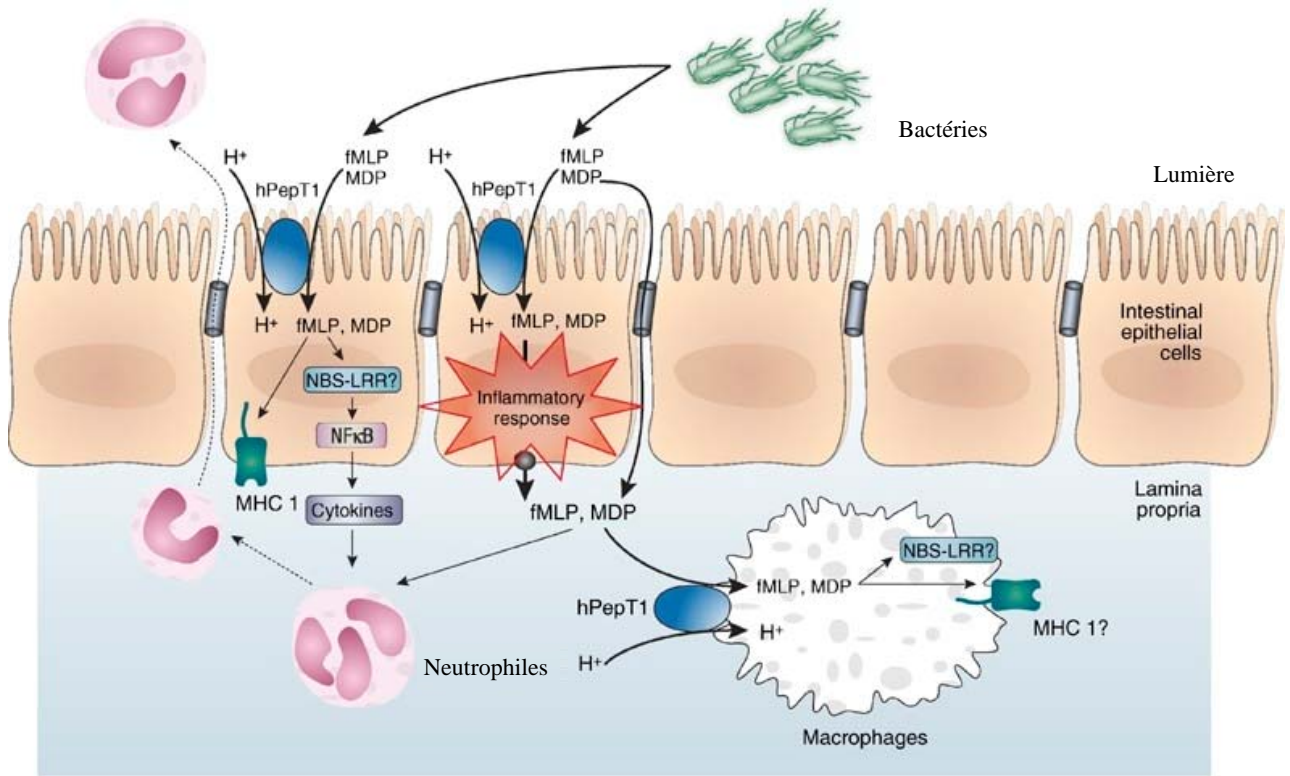
**Figure 21 : Régulation négative de la voie TLR2 par la voie NOD2.** **A.** Le peptidoglycane bactérien se lie au récepteur transmembranaire TLR2 et active cette voie de signalisation. Parallèlement, le MDP se fixe au domaine LRR du récepteur intracellulaire NOD2 qui va, une fois activé, exercer un rétrocontrôle négatif sur la voie TLR2. Ainsi, dans les conditions normales, il y a un équilibre entre les voies NOD2 et TLR2 qui permet de limiter la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-12 et de contrôler l'inflammation. **B.** Dans le cas où un patient exprime une protéine NOD2 mutée, le MDP n'activera plus la voie de signalisation NOD2 et le contrôle négatif de cette voie sur la voie TLR2 est levé. Le peptidoglycane active donc la voie TLR2 conduisant à une production accrue de IL-12 pouvant déclencher une réponse inflammatoire et une MC. Cette interaction entre les voies NOD2 et TLR2 permet de comprendre pourquoi les patients hébergeant des mutations dans le gène NOD2 sont prédisposés à développer une MC (modifiée d'après Watanabe *et al.*, 2004).

induite au sulfate de dextran sodique (DSS) due à une activation exacerbée de la voie NF- $\kappa$ B en réponse au MDP (Maeda *et al.*, 2005). Ce paradoxe aurait pour explication le fait que la signalisation issue du récepteur NOD2 sauvage régulerait négativement la réponse immunitaire innée initiée par les bactéries de la flore via les voies de signalisation TLR2, mais également TLR4, bloquant ainsi la production accrue de cytokines pro-inflammatoires, ce qui n'est pas le cas pour le variant NOD2 L1007fsinsC (Netea *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2004) (**Figure 21**). La perte de ce contrôle négatif induirait une perte de tolérance immunitaire et conduirait à une susceptibilité augmentée à développer une MC (Watanabe *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2008).

Deux études antérieures avaient également montré que le récepteur NOD2 contrôle la multiplication de bactéries intracellulaires telles que *Salmonella Typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis* et *Streptococcus pneumoniae* dans des cellules épithéliales intestinales humaines, alors que la protéine variante NOD2 L1007fsinsC, associée à la MC, n'est plus capable d'exercer cette fonction (Hisamatsu *et al.*, 2003; Meinzer *et al.*, 2008; Opitz *et al.*, 2004). Récemment, il a été montré que cette action bactéricide serait due en grande partie à la capacité de NOD2 à recruter rapidement la machinerie autophagique au niveau du site d'entrée des bactéries, en interagissant avec la protéine de l'autophagie ATG16L1 (Travassos *et al.*, 2010). Une seconde étude, en cellules dendritiques, confirme cette relation et approfondit celle-ci en montrant que non seulement le variant de NOD2 L1007fsinsC ne permet pas une autophagie efficace pour éliminer des bactéries intracellulaires AIEC (adherent-invasive *Escherichia coli*) associées à la MC, mais qu'il ne permet pas non plus une présentation correcte des antigènes via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Cooney *et al.*, 2010).

Des anomalies de différenciation cellulaire liées à un défaut de NOD2 ont été rapportées et participeraient fortement au développement de la MC. Les souris invalidées pour le gène *NOD2* présentent un développement anormal des plaques de Peyer, porte d'entrée pour les bactéries entéro-invasives, ainsi qu'une augmentation de la perméabilité intestinale et une réponse immunitaire mucoale exagérée, parfaitement en concordance avec la physiopathologie de la MC (Barreau *et al.*, 2007).

Par ailleurs, chez certains patients présentant une forme iléale de MC et un polymorphisme à risque au niveau du gène *NOD2*, un défaut de production de peptides antimicrobiens, les  $\alpha$ -défensines, a été observé au niveau des cellules de Paneth (Wehkamp *et al.*, 2004; Wehkamp *et al.*, 2005; Wehkamp *et al.*, 2009). Par contre, la diminution de



**Figure 22 : Implication du transporteur PepT1 dans les MICI.** Des produits bactériens, tel que le MDP, sont normalement présents dans la lumière intestinale. Le transporteur intestinal PepT1, qui est exprimé uniquement par les cellules épithéliales intestinales des zones inflammées, permet le transport de ces produits bactériens dans le cytoplasme cellulaire. Cela va aboutir à l’activation d’une réponse inflammatoire passant notamment par l’activation du récepteur cytosolique NOD2, l’activation de la voie NF-κB, et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (modifiée d’après Charrier *et al.*, 2006).

production de défensines pourrait être dépendante du contexte inflammatoire et non pas directement liée au statut NOD2 (Simms *et al.*, 2008).

L'ensemble des effets en relation avec l'expression d'une protéine NOD2 variante, que sont la perte du contrôle de bactéries intracellulaires par l'autophagie, l'augmentation de la perméabilité intestinale, et le défaut de production de défensines par les cellules de Paneth, renforcent l'hypothèse de l'implication d'agents bactériens dans l'étiologie de la MC.

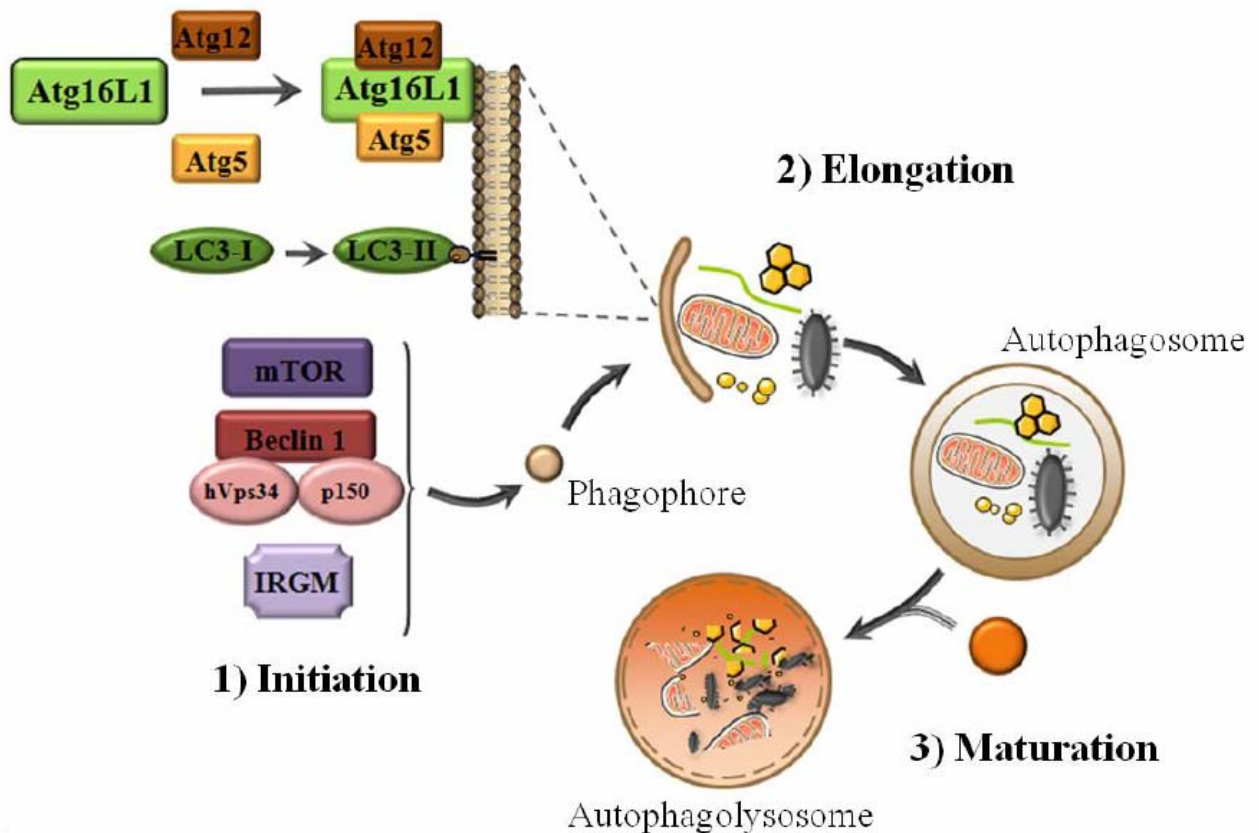
### II-2-3-2- PepT1

Le transporteur PepT1, codé par le gène SLC15A1, est impliqué dans le transport de produits bactériens, tel que le MDP, à l'intérieur des cellules épithéliales intestinales et des cellules immunitaires. Ce transport induit l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et la mise en place d'une inflammation (Dalmaso *et al.*, 2010). Ainsi, le transporteur PepT1, en induisant la présence intracellulaire de MDP, est capable d'activer la voie de signalisation passant par le récepteur intracytoplasmique NOD2 (**Figure 22**) (Charrier and Merlin, 2006). De manière intéressante, il a été montré la présence de polymorphismes au niveau du gène codant le transporteur PepT1, semblant être associés à une augmentation de l'activité du transporteur (Zucchelli *et al.*, 2009). De plus, ce transporteur présente une expression augmentée chez les patients atteints de maladie de Crohn (Merlin *et al.*, 2001), et il a récemment été montré que la surexpression de ce transporteur exacerbe les colites induites en modèle murin d'une manière NOD2 dépendante (Dalmaso *et al.*, 2011). L'ensemble de ces données suggèrent que le transporteur intestinal PepT1 pourrait jouer un rôle important dans la survenue de l'inflammation intestinale chez les patients atteints de maladie de Crohn, et ceci via un mécanisme passant par la voie de signalisation NOD2.

### II-2-3-3- Gènes de l'autophagie

L'autophagie est un processus ubiquitaire dans les cellules eucaryotes qui correspond à la dégradation d'éléments cytoplasmiques tels que des organites (mitochondrie, peroxyosome) ou des agrégats protéiques par les lysosomes.

Le processus autophagique se décompose schématiquement en 3 étapes : (i) une phase d'initiation durant laquelle se forme la membrane d'isolation, (ii) une phase d'élongation de la



**Figure 23 : Mécanisme moléculaire général de l'autophagie.** 1) **L'initiation** : en intégrant différents stimuli, les complexes protéiques de régulation de l'autophagie, mTor et Beclin-1 induisent la formation d'une membrane d'isolement, ou phagophore. 2) **L'élongation** : les 2 systèmes de conjugaison Atg16L1/Atg5/Atg12 et LC3 permettent l'élongation du phagophore et la séquestration d'éléments cytoplasmiques (protéines, organites ou bactéries). 3) **La maturation** : la fermeture de la double membrane conduit à la formation d'un autophagosome qui fusionne avec les lysosomes conduisant à la dégradation de la membrane interne et du contenu intravacuolaire (modifiée d'après Caprilli *et al.*, 2010).

membrane et (iii) une phase de maturation de l'autophagosome (**Figure 23**) (Caprilli *et al.*, 2010). L'autophagosome fusionne alors séquentiellement avec les endosomes précoces, puis tardifs, et enfin fusionne avec les lysosomes pour former un autophagolysosome (Mizushima, 2007). Ces événements conduisent à l'acidification de la vacuole et à la dégradation du contenu intraluminal et de la membrane interne par les enzymes lysosomiales telles que les cathepsines (Eskelinen, 2005).

L'autophagie est un processus biologique nécessaire au maintien de l'homéostasie cellulaire et au renouvellement des organites cellulaires. De plus, l'autophagie joue un rôle dans la réponse immunitaire innée et adaptative de l'hôte vis-à-vis des pathogènes et pourrait donc avoir un rôle clé dans la MC (Amer *et al.*, 2005; Amer and Swanson, 2005; Deretic, 2005; Gutierrez *et al.*, 2004; Levine and Deretic, 2007; Nakagawa *et al.*, 2004; Schmid and Munz, 2007a, b; Singh *et al.*, 2006). Les récentes études d'analyse du génome ont permis d'associer 2 gènes codant des protéines directement impliquées dans l'autophagie, ATG16L1 et IRGM, comme gènes de susceptibilité à la MC.

L'association du gène ATG16L1 avec un risque accru de MC a été mise en évidence pour la première fois en 2007 par Hampe et collaborateurs (Hampe *et al.*, 2007), et a été confirmée depuis par au moins 28 études d'association sur des populations de types caucasiennes (Brest *et al.*, 2010). Une méta-analyse et 5 études ont montré que le gène ATG16L1 est plus particulièrement associé à la forme iléale de la MC (Barrett *et al.*, 2008; Duerr *et al.*, 2006; Fowler *et al.*, 2008; Parkes *et al.*, 2007; Rioux *et al.*, 2007; Wellcome, 2007). Cette association à une forme iléale de la MC est particulièrement intéressante puisqu'elle oriente une implication d'ATG16L1 dans la forme la plus fréquente de la MC à laquelle sont associés également les polymorphismes à risque dans le gène *NOD2* et la présence anormale d'*Escherichia coli* appartenant au pathovar AIEC (détaillé dans le paragraphe III-3-4). Le polymorphisme associé à la MC (rs2241880, C1155>G) conduit à une substitution d'acide aminé lors de la traduction, T300A, suggérant un impact possible sur la fonction de la protéine. ATG16L1 joue un rôle fondamental dans le processus d'autophagie puisque sa présence est absolument nécessaire pour l'élongation de la membrane de l'autophagosome. Il a par la suite été montré que le processus autophagique est induit en réponse à l'infection par les *E. coli* adhérentes et invasives associées à la maladie de Crohn, et que la survie intracellulaire de la souche AIEC de référence LF82 est sélectivement augmentée dans un contexte de défaut d'autophagie (Lapaquette *et al.*, 2009). Un défaut



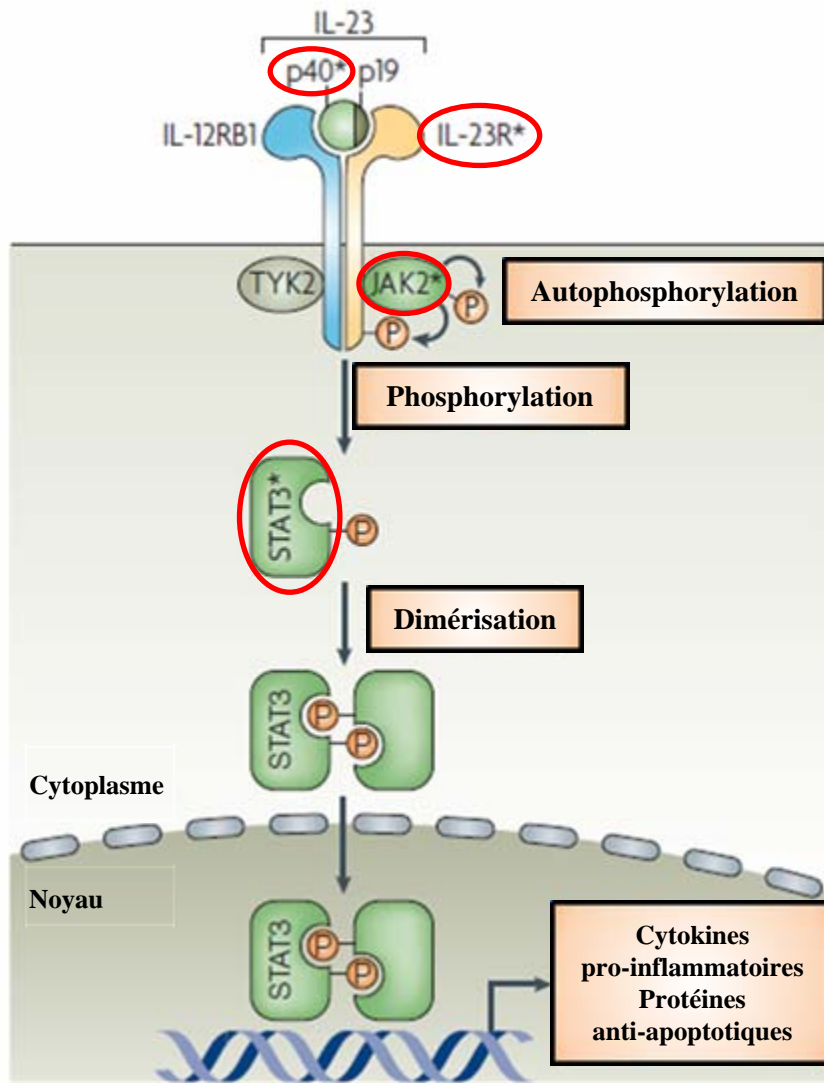
d'expression du gène de l'autophagie *ATG16L1*, associés à la MC, conduit à une survie accrue des AIEC dans les cellules épithéliales humaines (Lapaquette *et al.*, 2009).

Enfin, trois études ont récemment montré que le variant d'*ATG16L1* 300A perd sa capacité à être recruté à la membrane par le récepteur NOD2 dans des cellules épithéliales, des macrophages, et des cellules dendritiques lors d'une l'infection par des bactéries (Cooney *et al.*, 2010; Homer *et al.*, 2010; Travassos *et al.*, 2010), étayant l'hypothèse d'une perte de fonction de ce variant à risque. Ces trois études sont fondamentales dans la compréhension de la composante génétique de l'étiologie de la MC puisqu'elles soulignent le fait qu'un allèle à risque du gène *NOD2* ou du gène *ATG16L1*, fortement associés à la MC, conduit à l'altération de la même voie cellulaire : la gestion des bactéries intracellulaires par l'autophagie.

Le second gène associé à la MC et impliqué dans le processus autophagique code une guanosine triphosphatase, appelée IRGM (Immunity Related GTPase M). Il a été identifié dans la même vague d'études d'analyse du génome que le gène *ATG16L1* (Parkes *et al.*, 2007; Wellcome, 2007) avec, comme pour *ATG16L1*, une association préférentielle avec les formes iléales (Parkes *et al.*, 2007; Roberts *et al.*, 2008). Initialement, c'est un SNP « silencieux » dans la région codante du gène *IRGM* (C313T, rs10065172) qui a été associé à la MC, n'entraînant donc pas de changement d'acides aminés lors de la traduction de l'ARNm d'*IRGM* (Parkes *et al.*, 2007). Au cours de l'année suivante, ce polymorphisme a été montré comme étant associé à 100% avec une délétion de 20 kb en amont du gène *IRGM* ce qui pourrait donc altérer l'expression du gène *IRGM* en interférant avec la fixation de facteurs de transcription (McCarroll *et al.*, 2008; Prescott *et al.*, 2010). La fonction exacte de la protéine *IRGM* chez l'Homme est encore évasive. Les données disponibles pour le moment montrent que le niveau d'expression de la protéine *IRGM* est particulièrement important pour le ciblage des bactéries intracellulaires par l'autophagie. Par exemple, une surexpression d'*IRGM* augmente la proportion de bactéries *Salmonella* Typhimurium prises en charge par l'autophagie en cellules épithéliales humaines. A l'inverse une altération de l'expression d'*IRGM* par ARN interférence diminue la prise en charge des bactéries par l'autophagie (McCarroll *et al.*, 2008). De manière similaire, suite à l'altération de l'expression de la protéine *IRGM* en macrophages humains U937, la survie de *Mycobacterium tuberculosis* est augmentée (Singh *et al.*, 2006).

Récemment, une étude ayant pour but de comprendre comment le polymorphisme silencieux (C313T) localisé dans la séquence codante du gène *IRGM* pouvait conférer un





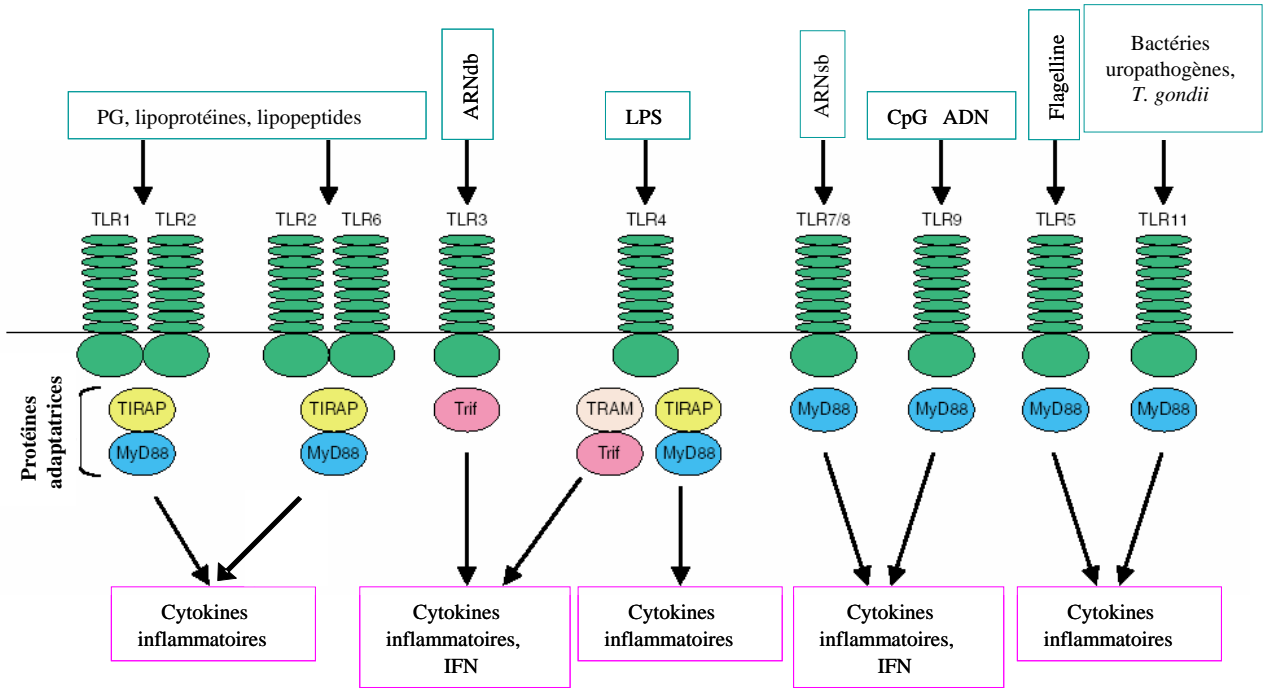
**Figure 24 : Signalisation initiée par le récepteur IL-23R conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17.** Le récepteur IL-23R est composé des deux sous-unités IL-23R et IL-12RB1 et a pour ligand le dimère des protéines p40 et p19 composant la cytokine IL-23. La fixation du ligand entraîne le recrutement de la protéine kinase JAK2 qui s'autophosphoryle et phosphoryle le récepteur IL23R sur un résidu tyrosine. Le facteur de transcription STAT3 est alors recruté à ce complexe et phosphorylé, conduisant à son homodimérisation puis sa translocation nucléaire afin d'activer la transcription de gènes cibles. STAT3 active essentiellement la transcription de gènes codant des cytokines pro-inflammatoires (dont l'IL-17) et des protéines anti-apoptiques. Les protéines dont les gènes sont associés à la MC sont entourées en rouge (modifiée d'après Cho, 2008 ).

risque accru de MC sans modifier la séquence de la protéine IRGM a révélée qu'une famille de microARN, miR-196 A et B, était surexprimée au niveau de l'épithélium intestinal (iléal ou colique) de patients atteints de MC, et ciblait l'ARN messager d'IRGM (Brest *et al.*, 2011b). Chez les patients porteurs de l'allèle à risque 313T d'IRGM, le miR-196 ne peut plus se fixer, et cela conduit à la perte de la répression de l'expression de la protéine IRGM. Cette étude a également montré que l'allèle à risque 313T d'IRGM conduit à une persistance accrue des bactéries AIEC intracellulaires (Brest *et al.*, 2011a; Brest *et al.*, 2011b).

#### II-2-3-4- IL23-R

L'inflammation de la MC implique la cytokine pro-inflammatoire IL-12, cytokine hétérodimérique comprenant les sous-unités IL-12p40 et IL-12p35, suggérant que la MC est en partie une maladie de type Th1 (Bouma and Strober, 2003; Strober *et al.*, 2002). La sous-unité IL-12p40 peut également se combiner avec la sous-unité IL-23p19 pour former l'IL-23 (Oppmann *et al.*, 2000). Des études cliniques ont mis en évidence plusieurs polymorphismes dans le gène IL23R, qui code une sous-unité du récepteur à l'IL-23 (Duerr *et al.*, 2006; Neurath, 2007; Parkes *et al.*, 2007; Wellcome, 2007). La sous-unité p40 et le facteur de transcription STAT3 (impliqué dans la transduction des signaux en aval de IL-23R) présentent également des polymorphismes associés à la MC (Barrett *et al.*, 2008) (**Figure 24**). De plus, il semble exister un risque encore supplémentaire de développer la MC chez les personnes cumulant plusieurs allèles à risque dans les gènes de cette voie, indiquant des interactions possibles (ou épistasie) entre ces gènes de susceptibilité (McGovern *et al.*, 2009).

Les activités pro-inflammatoires de l'IL-23 sont supportées par la sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17, produisant de l'IL-17, de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$  {Bettelli, 2005 #562}. L'IL-17 induit à son tour la production de peptides antimicrobiens et le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale. Ces données suggèrent que la MC serait une pathologie non seulement Th1, mais également Th17. L'association de plusieurs gènes de la voie IL-23/IL-17 avec la MC est un argument fort en faveur d'un rôle clé de ces médiateurs de la réponse immunitaire dans la génération de l'inflammation exacerbée observée dans la maladie. D'ailleurs des essais thérapeutiques basés sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre la sous unité p40 commune à IL-12 et IL-23 (Ustekinumab<sup>®</sup>) montrent des résultats encourageants dans le traitement de la MC (Dryden, 2009; Mannon *et al.*, 2004; Sandborn *et al.*, 2008).



**Figure 25 : Activation des récepteurs TLR et réponses immunitaire innée.** Le récepteur TLR2, en se dimérisant avec le TLR1 ou le TLR6, va reconnaître différents constituants bactériens (peptidoglycane (PG), lipoprotéines et lipopeptides triacylés ou diacylés). Le TLR3 reconnaît des molécules virales d'ARN double brin (db), le TLR4 reconnaît le LPS ainsi que les pili de type 1 bactérien, les TLR7/8 médient la reconnaissance d'imidazoquinolines (IQ) et de molécules d'ARN simple brin (sb), le TLR9 est activé par des îlots CpG d'ADN bactérien ou viral, le TLR5 reconnaît la flagelline, et le TLR11 murin reconnaît des composants de bactéries uropathogènes ou du parasite *Toxoplasma gondii*. L'activation des TLR déclenche l'activation de voies de signalisation par l'intermédiaire des protéines adaptatrices (TIRAP, MyD88, Trif ou TICAM1 et TRAM ou TICAM2) conduisant à l'activation de la transcription de gènes codant des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  et IL-12) et l'IFN  $\alpha$  et  $\beta$  (modifiée d'après Kawai and Akira, 2006).

### II-2-3-5- Toll-Like Receptor

Les récepteurs TLR, principalement localisés à la surface des monocytes-macrophages, jouent un rôle majeur dans la détection des bactéries et dans l'initiation des réponses de l'immunité innée (Cario, 2005; Kawai and Akira, 2006). Leur activation par des bactéries ou des produits bactériens entraîne des cascades de voies de signalisation conduisant à une augmentation de l'expression de gènes codant des cytokines pro-inflammatoires (**Figure 25**). Une augmentation de l'expression à la surface des cellules épithéliales intestinales de TLR4, récepteur activé par le LPS (lipopolysaccharide) bactérien, a été observée lors des MICI (Cario and Podolsky, 2000). Cette observation suggère que certains patients seraient génétiquement prédisposés à développer une réponse immunitaire anormale au niveau de la muqueuse intestinale, ou que ces patients, suite à une stimulation des entérocytes par des cytokines pro-inflammatoires, présenteraient une modification de l'expression de TLR4.

Par ailleurs, 2 polymorphismes (D299G et T399I) de TLR4 ont été mis en évidence, mais les conclusions des diverses études menées sur l'association entre polymorphisme TLR4 et MC sont différentes, vraisemblablement à cause des fonds génétiques ethniques différents entre les populations étudiées, indiquant donc que le polymorphisme de TLR4 ne constituerait qu'un facteur de risque mineur pour la MC (Arnott *et al.*, 2004; Brand *et al.*, 2005; Franchimont *et al.*, 2004; Oostenbrug *et al.*, 2005; Torok *et al.*, 2004b).

Il a également été observé une diminution de l'expression du récepteur TLR3, récepteur activé par des ARN double brin (Cario and Podolsky, 2000), et la présence d'un polymorphisme du promoteur du récepteur TLR9, activé par des motifs CpG de l'ADN bactérien (Torok *et al.*, 2004a).

La multiplicité des gènes ou des régions génétiques identifiés à travers les différents travaux et en particuliers les études d'association à l'échelle du génome renforce l'hypothèse de l'existence de plusieurs loci de prédisposition à la MC. Pour certains d'entre eux, il n'a pas été possible d'établir une corrélation entre mutation et phénotype, mais il est possible que certaines mutations dans des gènes donnés n'aient pas d'effet majeur et qu'une interaction de plusieurs susceptibilité génétique soit nécessaire pour que la susceptibilité à la MC soit augmentée.

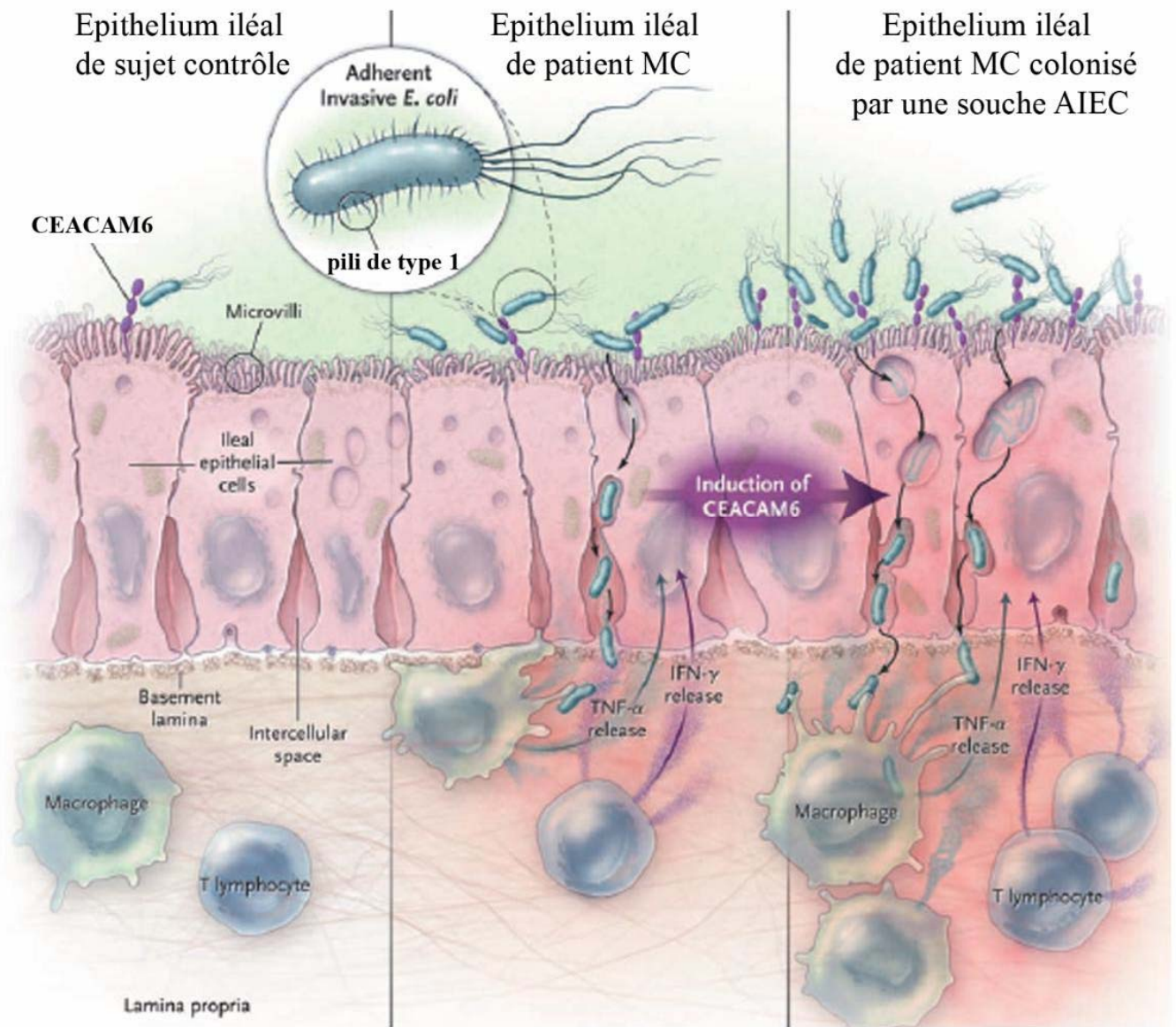


## II-2-4- Autres facteurs de l'hôte

### II-2-4-1- Stress du réticulum endoplasmique

Lorsque les cellules subissent un stress tel qu'une stimulation les obligeant à sécréter de grandes quantités de protéines, il peut y avoir une accumulation de protéines mal repliées au niveau du réticulum endoplasmique (RE), due à une saturation des complexes responsables du repliement et du contrôle de la qualité des protéines transitant par le RE, conduisant à un stress du RE. Une réponse UPR (Unfolded Protein Response, réponse aux protéines malformées) se met alors en place et se traduit par l'activation de 3 protéines, IRE1, PERK et ATF6. Celles-ci vont permettre d'inhiber la machinerie traductionnelle via la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  et d'induire la translocation nucléaire de facteurs de transcription comme XBP1 et AP-1 dans le but d'induire la transcription de gènes cibles codant des enzymes de dégradation protéique et des chaperonnes (Wu and Kaufman, 2006). De manière intéressante, une délétion du gène *Xbp1* dans les cellules épithéliales intestinales de souris conduit à des colites spontanées et une sensibilité accrue à des colites induites. Cela résulterait d'un dysfonctionnement des cellules de Paneth et d'un épithélium intestinal trop sensible à des stimuli inflammatoires tels que la présence de flagelline bactérienne ou de TNF- $\alpha$  (Kaser *et al.*, 2008). L'absence du facteur de transcription XBP1 empêche une réponse correcte au stress du RE, et mène à une activation forte de la kinase JNK conduisant à la transcription de gènes pro-inflammatoires et à une mort de la cellule (Kaser *et al.*, 2008). L'absence de ce facteur a également été associée à une activité autophagique accrue, suggérant que XBP1 aurait un effet modérateur sur l'autophagie induite lors d'un stress du RE (Hetz *et al.*, 2009). De plus, une absence d'expression de XBP1 diminue l'activité bactéricide dans les cryptes intestinales, et augmente la colonisation et la translocation bactérienne lors de l'infection de souris par *Listeria monocytogenes*. Deux polymorphismes dans le gène *Xbp1* (rs5997391 et rs35873774 (intron) ont été associés aux MICI (MC et RCH) et conduiraient à la production d'une protéine XBP1 avec une activité réduite par rapport à la protéine sauvage (Kaser *et al.*, 2008). Cependant cette association des variants de XBP1 avec la MC n'a pas été répliquée lors d'autres études d'association à l'échelle du génome, y compris les méta-analyses (Barrett *et al.*, 2008; Wellcome, 2007).

Une autre étude a permis d'étayer la piste d'une implication du stress du RE dans l'étiologie de la MC en montrant une expression anormale d'une protéine de stress du RE, Gp96, au niveau de l'épithélium iléal de patients atteints de MC (au niveau de muqueuses



**Figure 26 : Implication du récepteur CEACAM6 dans la colonisation de la muqueuse iléale des patients atteints de MC.** Les bactéries AIEC sont capables d'adhérer aux cellules épithéliales intestinales suite à la reconnaissance entre le récepteur CEACAM6 exprimé à la surface des entérocytes et les pili de type 1 variant exprimés par les bactéries. Les bactéries AIEC sont par la suite capable d'envahir ces cellules leur permettant ainsi de traverser l'épithélium intestinal, ainsi que de se multiplier dans les cellules immunitaires sous-jacentes entraînant de fortes sécrétions de TNF- $\alpha$  par les macrophages infectés. Les bactéries AIEC elles même, mais également les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ , sont capables d'induire l'expression de CEACAM6 au niveau des cellules épithéliales intestinales, ce qui amplifierait la colonisation par les bactéries AIEC (modifiée d'après Barnich *et al.*, 2007 et Abraham and Cho, 2009).

inflammatoires de 50% de patients atteints de MC, au niveau de muqueuses saines de 34% de patients atteints de MC, et chez 0% des contrôles) (Rolhion *et al.*, 2010). La protéine Gp96 est décrite dans la littérature comme une “immunochaperonne”. C’est une des glycoprotéines les plus abondantes du RE, et elle a été décrite comme impliquée dans la maturation de TLRs (TLR1, 2 et 4) et de certaines intégrines (Randow and Seed, 2001). Gp96 a été caractérisée comme un facteur important pour l’internalisation des *E. coli* AIEC associés à la MC, suggérant que la présence de bactéries intracellulaires au niveau de la muqueuse intestinale pourrait être potentialisée en cas de stress du RE (cf chapitre III-3-4-7-3) (Rolhion *et al.*, 2010; Rolhion *et al.*, 2011).

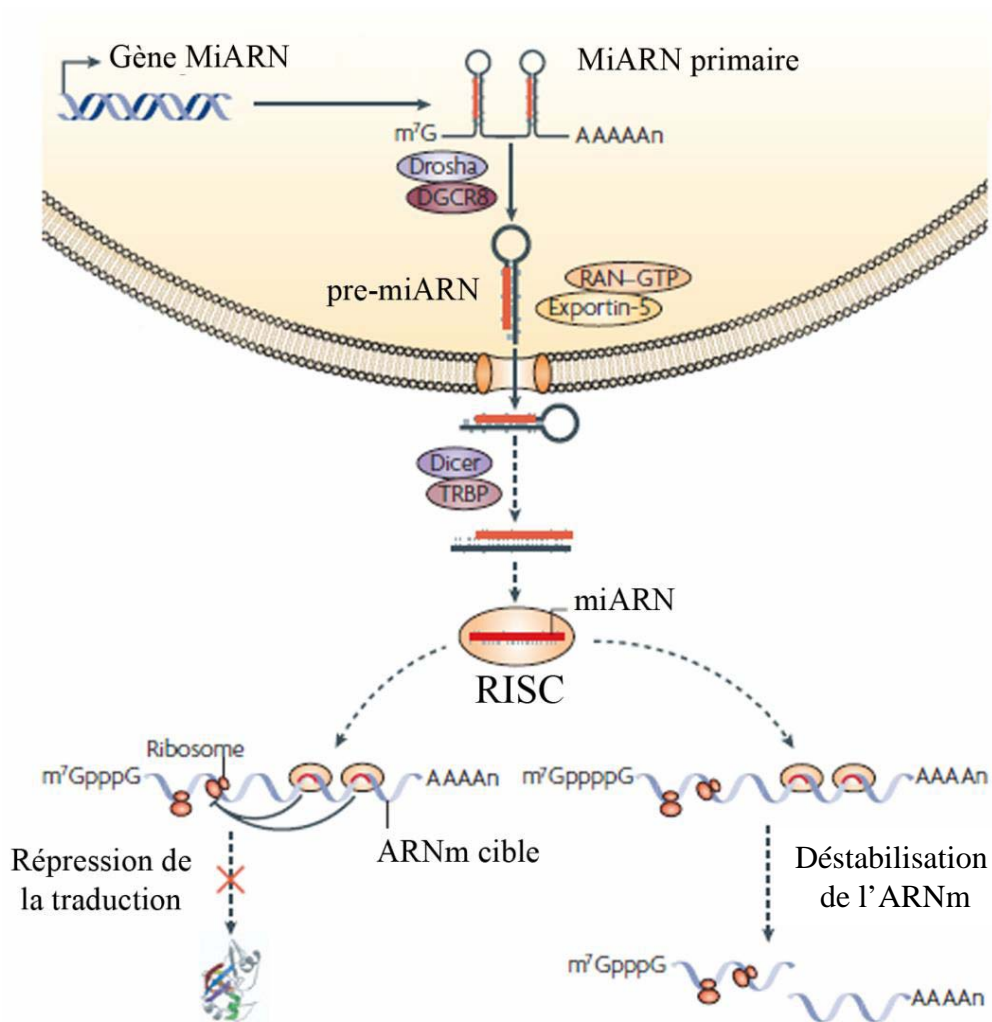
L’ensemble de ces données souligne l’importance d’une altération du stress du RE, en particulier dans une susceptibilité accrue des patients avec maladie de Crohn à être colonisés par des bactéries à tropisme intracellulaire soit en raison de défauts d’autophagie liés au stress du RE soit en raison d’une internalisation bactérienne facilitée.

#### II-2-4-2- Le récepteur CEACAM6

Le récepteur CEACAM6 (Carcinoembryonic Antigen–related Cell Adhesion Molecule 6) est anormalement exprimé au niveau de la muqueuse iléale lésée chez 35% des patients MC, ce qui n’est pas observé chez des sujets contrôles (**Figure 26**). Cette expression est essentiellement localisée à la bordure en brosse des entérocytes (Barnich *et al.*, 2007). Une expression est observée même au niveau des zones saines de la muqueuse iléale des patients atteints de MC, ce qui n’est pas le cas chez les patients contrôles. CEACAM6 est exprimé au niveau de la muqueuse colique mais son expression n’est pas modifiée chez les patients atteints de MC, suggérant uniquement une association entre expression accrue et formes iléales de MC.

Ce récepteur est modifié post-traductionnellement et présente d’importantes glycosylations, en particulier l’ajout de résidus mannoses. L’expression anormale du récepteur CEACAM6 permettrait une colonisation de la muqueuse iléale des patients atteints de MC par les bactéries AIEC, via la reconnaissance entre les résidus mannose du récepteur CEACAM6 et les pili de type 1 variants exprimés par les bactéries AIEC (Barnich *et al.*, 2007). Cette hypothèse a d’ailleurs été validée dans un modèle de souris transgéniques CEABAC10 exprimant le récepteur CEACAM6 humain. Les bactéries AIEC, mais pas les





**Figure 27 : Biogenèse et maturation des microARN.** La synthèse et la maturation des miARN s'effectuent en 4 étapes successives : (i) la transcription d'un miARN primaire, (ii) son clivage par l'endonucléase Drosha pour générer un précurseur de pré-miARN, (iii) l'export du pré-miARN dans le cytoplasme par un mécanisme dépendant de l'exportine 5, (iv) le clivage du pré-miARN par Dicer et sa prise en charge dans le complexe RISC. L'activité hélicase du complexe RISC permet de séparer les 2 brins du miARN afin de permettre son appariement à l'ARNm cible. Le miARN peut réguler la transcription d'un ARNm cible par plusieurs voies basées soit sur la répression de la traduction, soit sur la déstabilisation de l'ARNm (modifiée d'après Lodish *et al.* 2008).

bactéries *E. coli* K-12 non pathogènes, sont capables de persister au niveau intestinal et d'induire une colite sévère chez les souris CEABAC10 (Carvalho *et al.*, 2009).

La cause de la surexpression de CEACAM6 chez les patients n'est pas clairement définie, mais il a pu être montré *in vitro* que le récepteur pouvait être surexprimé dans des cellules épithéliales intestinales suite à une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) mais également lors de l'infection par des bactéries AIEC. Ainsi les bactéries AIEC seraient capables de promouvoir leur colonisation en induisant une expression accrue de ce récepteur à la surface des cellules hôtes (Abraham and Cho, 2009; Barnich *et al.*, 2007).

#### II-2-4-3- Les microARN régulateurs

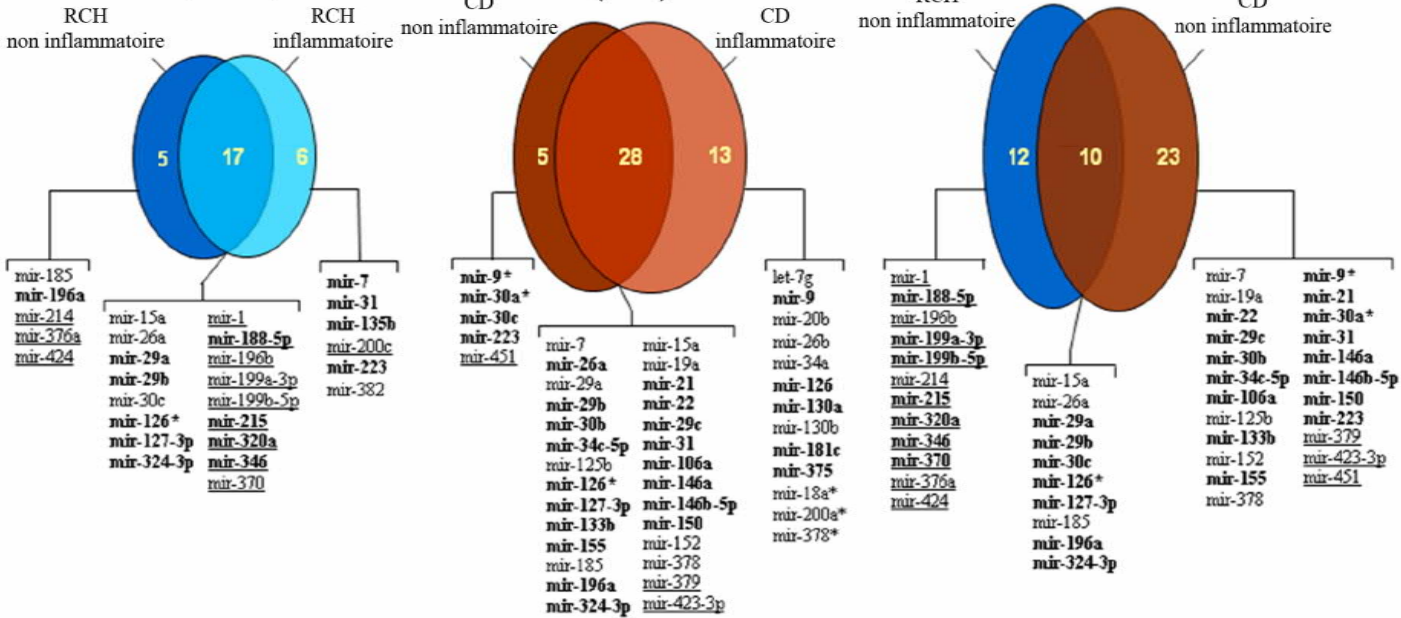
Les microARN (miARN) sont des ARN non codants de 21 à 23 nucléotides de long dont la fonction est de réguler post-transcriptionnellement l'expression de gènes. La synthèse et la maturation des miARN s'effectuent en 4 étapes successives : (i) la transcription d'un microARN primaire, (ii) son clivage par l'endonucléase Drosha pour générer un précurseur de pré-microARN, (iii) l'export du pré-microARN dans le cytoplasme, (iv) le clivage du pré-microARN par Dicer et RISC (**Figure 27**) (Bartel, 2004; Lodish *et al.*, 2008). Le microARN mature interagit ensuite avec la région 3'UTR des ARN messagers cibles et régule négativement leur traduction par différentes voies. De nombreuses études montrent que ces microARN ont un rôle régulateur majeur dans de nombreux processus physiologiques. Des expressions anormales de certains microARN ont d'ailleurs été associées à des pathologies. Par exemple, les miARN de la famille let-7 sont des régulateurs négatifs de la protéine oncogène Ras et sont sous-exprimés dans de nombreux cancers (Roush and Slack, 2008).

Concernant les MICI, une première étude a montré une expression modifiée (positivement ou négativement) de 33 microARN en zone non inflammatoire chez des patients atteints de MC. Parmi ceux-ci, 10 sont également exprimés différemment chez des patients atteints de RCH (Fasseu *et al.*, 2010) (**Figure 28**). Deux autres études montrent une modification de l'expression de microARN dans le cas de la MC, une sur des biopsies coliques et iléales (Wu *et al.*, 2010b) et une sur des cellules du sang périphérique (Wu *et al.*, 2010a). Des travaux récents ont montré l'implication fonctionnelle des miR-196 A et B dans la régulation de l'expression d'IRGM et du processus autophagique (cf paragraphe III-3-4-3,

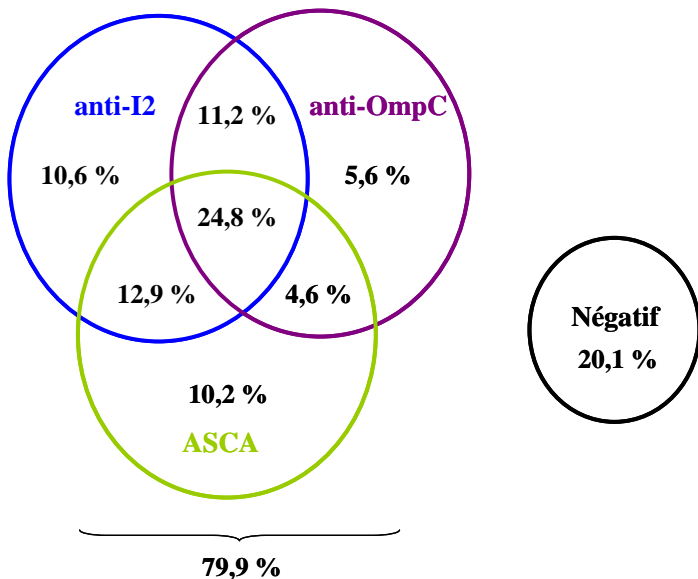
## Rectocolite hémorragique (RCH)

## Maladie de Crohn (MC)

## RCH versus MC



**Figure 28 : Altération de l'expression de microARN (miARN) dans le cadre de la rectocolite hémorragique (RCH) et de la maladie de Crohn (MC).** L'expression des miARN est mesurée dans des tissus non inflammatoires ou inflammatoires issus de biopsies coliques de patients atteints de MC ou de RCH, et comparée à celle mesurée chez des sujets contrôles. Sur les deux premiers diagrammes, le nombre total de miARN sous-exprimés ou surexprimés chez les patients atteints de RCH ou de MC, en zone non inflammatoire et/ou inflammatoire, est indiqué dans les ovales de couleur. Le troisième diagramme compare les miARN dont l'expression est modifiée en zone non inflammatoire chez les patients atteints de RCH ou de MC. Le chiffre à l'intersection des deux ovales indiquent le nombre de miARN dont l'expression est modifiée dans les deux pathologies. Les noms des miARN sont indiqués sous les diagrammes, les miARN sous-exprimés sont soulignés, les miARNs dont l'expression présente une différence d'expression significative ( $P < 0,05$ ) sont en gras (d'après Fasseu *et al.*, 2010).



**Figure 29 : Pourcentage de patients atteints de MC dépistés positifs pour la recherche d'anticorps dirigés contre 3 antigènes microbiens.** Les anticorps recherchés étaient : les anticorps anti-I2 dirigés contre la séquence I2 associée à *Pseudomonas fluorescens*, les anticorps anti-OmpC (Outer membrane protein C) dirigés contre une protéine de membrane externe de *Escherichia coli*, et les anticorps ASCA (Anti-*Saccharomyces cerevisiae* Antibodies) dirigés contre *Saccharomyces cerevisiae* (Mow *et al.*, 2004).

(Brest *et al.*, 2011b). Ainsi, l'étude de l'expression anormale de microARN dans la physiopathologie de la MC et de leurs impacts fonctionnels, notamment dans la régulation de gènes de susceptibilité, semblent très prometteuse.

#### II-2-5- Rôle du microbiote intestinal et facteurs infectieux

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

**Les données clinicopathologiques** montrent que les manifestations cliniques associées à la MC, incluant les manifestations extra-intestinales, peuvent être partiellement mimées par des infections avec des bactéries pathogènes à tropisme intestinal telles que *Campylobacter*, *Shigella* et *Yersinia*. Les lésions de la MC surviennent préférentiellement au niveau de l'iléon terminal et du côlon qui sont les régions de l'intestin présentant les concentrations les plus élevées en bactéries. Ces lésions présentent des caractéristiques anatomo-pathologiques similaires à celles qui sont associées à des infections microbiennes intestinales (ulcérations, micro-abcès, fissures, fistules, granulomes) (Sartor, 1995). Par ailleurs, des concentrations très élevées de bactéries ont été retrouvées au niveau de la muqueuse de patients atteints de MICI comparativement à des sujets contrôles. Cette forte colonisation est accompagnée de la présence de bactéries internalisées dans les biopsies de patients (Swidsinski *et al.*, 2002). L'hypothèse de l'implication de micro-organismes dans la MC est renforcée par le fait que l'utilisation d'antibiotiques s'avère parfois efficace dans le traitement de la MC (Khan *et al.*, 2011). De plus, la mise en évidence de taux élevés d'anticorps dirigés contre 4 antigènes microbiens (anticorps anti-ASCA, anti-OmpC de *E. coli*, anti-I2 et anti-flagelline) chez les patients atteints de MC conforte l'hypothèse de l'implication d'agents microbiens dans l'étiologie de cette pathologie (**Figure 29**) (Landers *et al.*, 2002; Quinton *et al.*, 1998; Sendid *et al.*, 1996; Sutton *et al.*, 2000; Targan *et al.*, 2005). Il est à noter qu'environ 80 % des patients atteints de MC développent des anticorps dirigés contre au moins un de ces antigènes (Landers *et al.*, 2002; Mow *et al.*, 2004a).

**Tableau 4 : Modèles expérimentaux mettant en évidence le rôle du microbiote intestinal dans l'inflammation intestinale** (d'après Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2011).

Modèle animal	Phénotype	Implication du microbiote intestinal dans le développement de l'inflammation	Références
Rats transgéniques HLA-B27/ $\beta_2$ -microglobuline humaine	Gastroduodérite et colite spontanée, arthrite, spondylite, avec une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires	Les rats axéniques ne présentent pas de colite. La colite est restaurée suite à la colonisation des animaux axéniques	(Hammer <i>et al.</i> , 1990; Rath <i>et al.</i> , 1996)
Souris avec mutations inactivatrices dans le TCR ( <i>T cell receptor</i> )	Colite spontanée avec une réponse cytokinique déséquilibrée et une production d'auto-anticorps	L'inflammation intestinale est initiée par un organisme normalement présent dans la flore intestinale	(Dianda <i>et al.</i> , 1997; Mombaerts <i>et al.</i> , 1992; Philpott <i>et al.</i> , 1992)
Souris <i>IL10</i> <sup>-/-</sup>	Réponse immunitaire non contrôlée en réponse aux antigènes luminaux	Les animaux axéniques ne présentent pas de colite, et le traitement antibiotique diminue fortement la colite	(Hoentjen <i>et al.</i> , 2003; Kuhn <i>et al.</i> , 1993; Sellon <i>et al.</i> , 1998; Tamagawa <i>et al.</i> , 2007)
Souris C3H/HeJBir	Colite spontanée	Le transfert adoptif de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> des souris C3H/HeJBir aux souris <i>scid/scid</i> induit une colite	(Cong <i>et al.</i> , 1998; Sundberg <i>et al.</i> , 1994)
Souris <i>senescence accelerated mouse</i> (SAM) P1/Yit	Inflammation iléale spontanée, avec un défaut de la barrière intestinale	L'inflammation intestinale est réduite en condition axénique.	(Matsumoto <i>et al.</i> , 1998; Olson <i>et al.</i> , 2006)
Souris <i>IL2</i> <sup>-/-</sup>	Inflammation iléale spontanée	Les souris axéniques ne développent qu'une inflammation iléale modérée	(Schultz <i>et al.</i> , 1999)
Souris <i>Tbet</i> <sup>-/-</sup>	Colite spontanée	La colite observée chez les souris <i>Tbet</i> <sup>-/-</sup> est transmissible aux animaux sauvages	(Garrett <i>et al.</i> , 2007)
Souris <i>IL10R2</i> <sup>-/-</sup> <i>TGF-<math>\beta</math>RII</i> <sup>-/-</sup>	Production anormale de cytokines pro-inflammatoires	Le traitement antibiotique restaure une production normale de cytokines	(Kang <i>et al.</i> , 2008)

**Les études d'associations génétiques**, comme cela a été développées dans le chapitre II-2-3, ont permis d'identifier des mutations dans de nombreux gènes, en particulier des gènes codant des récepteurs de l'immunité innée et adaptative, impliqués dans la reconnaissance de produits bactériens et dans la voie de l'autophagie permettant l'élimination de microorganismes (Khor *et al.*, 2011). Ces susceptibilités génétiques peuvent ainsi entraîner une augmentation de la quantité de bactéries au niveau intestinal, responsable d'une importante stimulation de la réponse immunitaire.

**Les observations expérimentales** montrent l'importance de la flore bactérienne dans l'induction d'un état inflammatoire dans les modèles animaux mimant une inflammation intestinale (Elson *et al.*, 2005) (**Tableau 4**). Par exemple, des souris transgéniques invalidées pour le gène codant la cytokine IL-10 développent des colites spontanées, sauf si elles sont élevées en condition axénique (Germ-free) (Kuhn *et al.*, 1993; Sellon *et al.*, 1998). Cela suggère bien un rôle important des bactéries dans l'étiologie de l'inflammation chronique. Chez l'Homme, le rôle de la flore bactérienne endogène dans la MC a été bien défini à l'aide du modèle de récurrence endoscopique après chirurgie (**Tableau 5**) (Rutgeerts *et al.*, 1991). Après résection chirurgicale iléocolique droite suivie d'une anastomose entre l'intestin grêle et le côlon, une récurrence endoscopique survient dans 73% des cas lors de la première année. Cette récurrence survient très peu de temps après le rétablissement du circuit normal permettant au flux fécal de baigner à nouveau la région anastomotique. Par contre, l'anastomose reste indemne de lésions si elle est protégée du flux fécal par une stomie en amont (Rutgeerts *et al.*, 1991). De plus, l'instillation du fluide fécal autologue dans l'iléon exclu de patients en rémission déclenche une réponse inflammatoire de la muqueuse et l'apparition de lésions aiguës présentant des caractères histologiques et immunohistochimiques caractéristiques d'une récurrence de MC (D'Haens *et al.*, 1998).

Différentes théories, qui ne s'excluent pas mutuellement, ont été élaborées quant au rôle de la microflore intestinale dans la maladie de Crohn, notamment la théorie de la dysbiose et la théorie d'un agent infectieux pathogène persistant au niveau intestinal.



**Tableau 5 : Arguments montrant l'implication du microbiote intestinal dans l'étiologie de la maladie de Crohn chez l'Homme (d'après Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2011).**

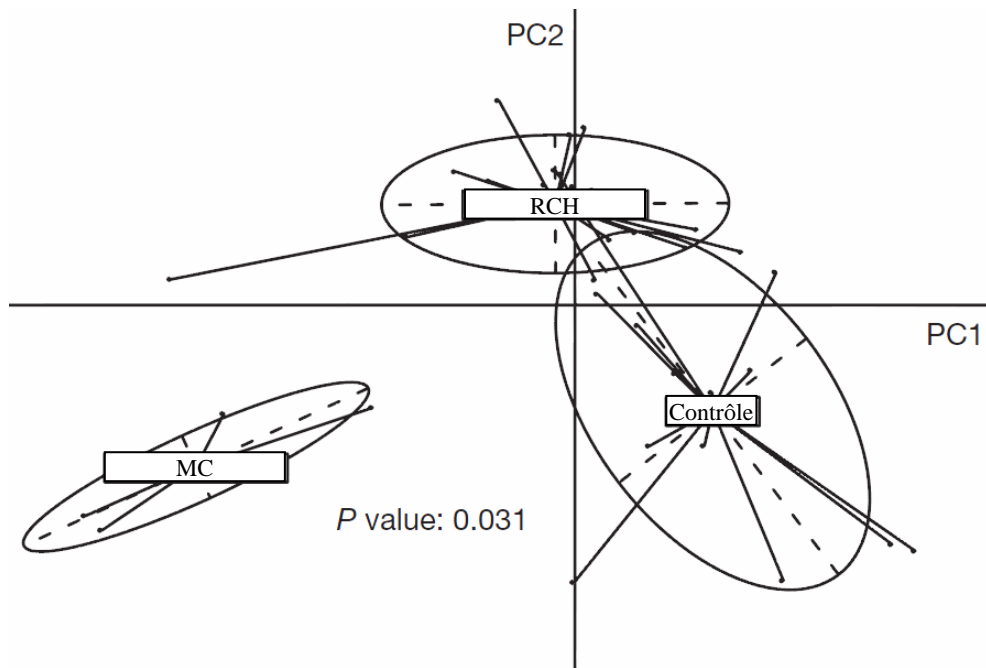
Données montrant l'implication du microbiote dans les MICI	MC, maladie de Crohn; RCH, rectocolite hémorragique)	Références
L'élimination du flux fécal permet de prévenir la récurrence de la maladie au niveau de l'iléon neoterminal	MC	(Rutgeerts <i>et al.</i> , 1991)
La restauration du flux fécal engendre une récurrence de la maladie	MC	(D'Haens <i>et al.</i> , 1998)
Les traitements antibiotiques (metronidazole, ciprofloxacine ou rifaximin) sont associés à une amélioration des symptômes chez les patients	MC et RCH	(Feller <i>et al.</i> , 2010; Sartor, 2004; Selby <i>et al.</i> , 2007; Thia <i>et al.</i> , 2009)
Plus forte réactivité du sérum contre des antigènes bactériens	MC	(Lodes <i>et al.</i> , 2004; Mow <i>et al.</i> , 2004b)
Défaut de la barrière intestinale	MC	(Gassler <i>et al.</i> , 2001; Hollander <i>et al.</i> , 1986; Zeissig <i>et al.</i> , 2007)
Augmentation de la translocation bactérienne	MC	(Keita <i>et al.</i> , 2008)
Altération de la barrière de mucus	RCH	(Braun <i>et al.</i> , 2009)
Augmentation des bactéries mucolitiques ( <i>Ruminococcus gnavus</i> et <i>torques</i> ) au niveau du colon	MC et RCH	(Martinez-Medina <i>et al.</i> , 2006; Png <i>et al.</i> , 2010; Willing <i>et al.</i> , 2009)
Augmentation des bactéries associées à la muqueuse et au mucus ( $\gamma$ -proteobacteria, actinobacteria et bifidobacteria)	MC et RCH	(Andoh <i>et al.</i> , 2007; Frank <i>et al.</i> , 2007; Swidsinski <i>et al.</i> , 2007)
Augmentation des bactéries intra-épithéliales	MC	(Baumgart <i>et al.</i> , 2007; Conte <i>et al.</i> , 2006; Darfeuille-Michaud <i>et al.</i> , 1998; Kotlowski <i>et al.</i> , 2007; Martin <i>et al.</i> , 2004; Martinez <i>et al.</i> , 2008; Mylonaki <i>et al.</i> , 2005; Neut <i>et al.</i> , 2002; Swidsinski <i>et al.</i> , 2002; Swidsinski <i>et al.</i> , 2007)





**Tableau 5, suite : Arguments montrant l'implication du microbiote intestinal dans l'étiologie de la maladie de Crohn chez l'Homme**  
(d'après Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2011).

Données montrant l'implication du microbiote dans les MICI	Maladie (MC, maladie de Crohn; RCH, Rectocolite hémorragique)	Références
Diminution de la biodiversité microbienne au niveau de la muqueuse et dans les selles	MC et RCH	(Frank <i>et al.</i> , 2007; Manichanh <i>et al.</i> , 2006; Martinez <i>et al.</i> , 2008; Mondot <i>et al.</i> , 2011; Nishikawa <i>et al.</i> , 2009; Ott <i>et al.</i> , 2004; Willing <i>et al.</i> , 2010)
Diminution des Feacalibacteria ( <i>Feacalibacterium prausnitzii</i> ) au niveau de la muqueuse et dans les selles	MC et RCH	(Baumgart <i>et al.</i> , 2007; Frank <i>et al.</i> , 2007; Mondot <i>et al.</i> , 2011; Sokol <i>et al.</i> , 2008; Willing <i>et al.</i> , 2010)
Diminution de la sécrétion de peptides antimicrobiens	MC et RCH	(Nuding <i>et al.</i> , 2007; Wehkamp <i>et al.</i> , 2005)
Plusieurs gènes de susceptibilité à la maladie de Crohn sont impliqués dans la prise en charge de bactéries intracellulaire ou dans la sécrétion de peptides antimicrobiens ( <i>NOD2</i> , <i>ATG16L1</i> , <i>IRGM</i> )	MC	(Cadwell <i>et al.</i> , 2008; Hampe <i>et al.</i> , 2007; Hugot <i>et al.</i> , 2001; Ogura <i>et al.</i> , 2001; Rioux <i>et al.</i> , 2007; Wehkamp <i>et al.</i> , 2004; Manichanh <i>et al.</i> , 2006)



**Figure 30 : Comparaison du microbiote intestinal chez des patients atteints de maladie de Crohn (MC), de rectocolite hémorragique (RCH), et chez des sujets contrôles.** Analyse en composante principale du microbiote intestinal chez 14 individus sains, 21 patients atteints de RCH et chez 4 patients atteints de MC (Qin *et al.*, 2010).

### II-2-5-1- Translocation bactérienne excessive

La translocation bactérienne (passage de bactéries viables de la lumière du tractus gastro-intestinal vers les nodules mésentériques et les autres organes internes, principalement le foie et la rate) est augmentée chez les patients atteints de MC. En effet, chez ces patients, certaines bactéries ou antigènes bactériens présents dans la lumière intestinale, telles que *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *Clostridium perfringens*, *Proteus spp.* et *Bacteroides fragilis*, sont retrouvées au niveau des ganglions mésentériques indiquant un franchissement de la barrière épithéliale (Ambrose *et al.*, 1984; Takesue *et al.*, 2002). De plus, les lésions précoces de MC sont retrouvées au niveau des follicules lymphoïdes de l'intestin, des plaques de Peyer de l'intestin grêle chez les sujets jeunes, et des follicules du côlon à tout âge (Fujimura *et al.*, 1996; Gullberg and Soderholm, 2006; Morson, 1972). Une augmentation du passage de *E. coli* à travers la muqueuse iléale au niveau des follicules lymphoïdes et des plaques de Peyer chez les patients atteints de MC a été rapportée (Keita *et al.*, 2008; Salim *et al.*, 2009; Salim and Soderholm, 2011). Par ailleurs, des souches de *E. coli* sont plus fréquemment isolées à partir de séreuses intestinales et de ganglions mésentériques prélevés lors d'actes chirurgicaux chez les patients atteints de MC que chez les contrôles, indiquant qu'une translocation bactérienne pourrait être impliquée dans la formation des fistules et des abcès, lésions observées dans la MC (Laffineur *et al.*, 1992).

### II-2-5-2- La dysbiose

L'étude de la microflore intestinale des patients atteints de MC, par technique de culture ou par analyse moléculaire, a permis de mettre en évidence une dysbiose généralisée ou localisée, correspondant à la diminution du nombre de bactéries habituelles, à l'augmentation du nombre de bactéries inhabituelles et quelquefois à la réduction de la biodiversité des espèces bactériennes. L'analyse taxonomique de la population bactérienne de la microflore intestinale des patients atteints de MC a ainsi révélé que cette dernière diffère de la microflore intestinale des patients atteints de RCH et des patients contrôles (Qin *et al.*, 2010) (**Figure 30**).

La composition de la flore fécale diffère entre patients atteints de MICI et sujets sains et la concentration des entérobactéries est bien plus importante chez les personnes atteintes de MICI, pouvant même représenter la flore intestinale dominante (Dickinson *et al.*, 1980;



Keighley *et al.*, 1978; Ruseler-van Embden and Both-Patoir, 1983; Seksik *et al.*, 2003; Swidsinski *et al.*, 2009; Willing *et al.*, 2009). Il a aussi été montré qu'au moins 30% de la flore dominante chez les patients atteints de MICI appartient à des groupes phylogéniques non retrouvés dans la flore des sujets contrôles (Seksik *et al.*, 2003). Ces changements de composition de flore fécale semblent être différents entre patients atteints de MC, de RCH et/ou d'infection colique, indiquant que ces modifications de flore ne sont pas uniquement dues à des changements de conditions du tractus gastro-intestinal, tel qu'un environnement inflammatoire (Joossens *et al.*, 2011). Une diminution des Firmicutes caractérise également les MICI, avec notamment une diminution significative du groupe *Clostridium cocoïdes* chez les patients atteints de RCH et de *Clostridium leptum* chez les patients atteints de MC (Sokol *et al.*, 2008b). Il a également été observée une augmentation des bactéries mucolitiques telles que *Ruminococcus gnavus* et *Ruminococcus torques*, bactéries capables de dégrader le mucus recouvrant les cellules épithéliales intestinales, chez les patients atteints de MC (Joossens *et al.*, 2011; Martinez-Medina *et al.*, 2006; Png *et al.*, 2010; Willing *et al.*, 2009). Enfin, la composition de la flore fécale semble instable au cours du temps chez les patients atteints de MC, alors qu'elle est constante chez des sujets sains (Seksik *et al.*, 2003).

La flore associée à la muqueuse est généralement différente de la flore fécale (Lepage *et al.*, 2005). Plusieurs études ont montré que la population bactérienne mucosale totale est plus importante en quantité chez les patients atteints d'une MICI comparativement à des sujets sains, que ce soit au niveau du mucus ou à la surface de l'épithélium intestinal (Kleessen *et al.*, 2002; Schultsz *et al.*, 1997; Swidsinski *et al.*, 2002; Swidsinski *et al.*, 2005). Une diminution des genres bactériens bénéfiques tels que *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, et une augmentation des bactéries à potentiel pathogène, telles que *Bacteroides* ou *E. coli*, associées à la muqueuse intestinale, ont été observées chez les patients atteints de MC (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Giaffer *et al.*, 1991, 1992; Keighley *et al.*, 1978; Manichanh *et al.*, 2006; Neut *et al.*, 2002; Sokol *et al.*, 2006; Sokol *et al.*, 2008b; Swidsinski *et al.*, 2002; Swidsinski *et al.*, 2005; Tamboli *et al.*, 2004). En parallèle, des analyses de flore iléale de patients atteints de MC ont montré une diminution significative de la concentration de *Faecalibacterium prausnitzii*, bactérie à potentiel immunomodulateur et anti-inflammatoire (Sokol *et al.*, 2008b).

L'ensemble de ces résultats conforte l'hypothèse d'une perturbation de la balance entre les bactéries potentiellement bénéfiques et les bactéries potentiellement pathogènes qui pourrait contribuer à l'initiation et/ou à la chronicité des MICI.



### II-2-5-3- Implication d'un agent infectieux

Les similitudes entre la MC et certaines formes d'entéocolites infectieuses suggèrent que plusieurs agents infectieux à tropisme intestinal pourraient participer à l'étiologie de la MC. Les différentes études menées se sont orientées vers l'étude de l'implication de virus comme par exemple le virus de la rougeole, de levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*, ou de bactéries non commensales du tube digestif pouvant engendrer des altérations physiopathologiques présentant des similitudes avec celles retrouvées dans la MC (Chiba *et al.*, 1998a; Chiba *et al.*, 1998b; Kallinowski *et al.*, 1998). Cependant, en conséquence de résultats controversés ou non reproductibles, ces études n'ont pas pu définir clairement le rôle de ces agents infectieux dans la MC. En revanche, les études menées sur *Mycobacterium avium* spp. Paratuberculosis (MAP). et sur *E. coli* permettent de suspecter un rôle de ces microorganismes dans l'étiologie de la MC.

## III- Microorganismes et maladie de Crohn

### III-1- Implication d'un agent viral

Pendant des décennies, l'apparition de la MC et d'inflammations aiguës ont été associées avec des infections virales, notamment à cause de l'âge des personnes malades (15-25 ans), personnes les plus souvent exposées aux infections virales. La principale hypothèse est le développement d'une vasculite au niveau de la muqueuse intestinale par une infection virale persistante de l'endothélium mésentérique. Pour valider cette théorie, la présence d'agents viraux par différentes techniques dans les tissus des patients atteints de MC a été recherchée, mais les résultats n'ont pas permis de démontrer le rôle exact des virus dans la MC. Des recherches moléculaires par PCR ou RT-PCR ont par exemple été réalisées pour de nombreux ADN ou ARN viraux dans les tissus de patients atteints de MC (Van Kruiningen *et al.*, 2007). Seul le virus d'Epstein Barr (EBV) a été détecté chez 15% des patients et aucun entérovirus n'a été détecté dans les tissus intestinaux. L'implication du virus de la rougeole dans l'étiologie et/ou la pathogenèse de la MC a également été suggérée (Daszak *et al.*, 1997; Miyamoto *et al.*, 1995; Wakefield *et al.*, 1993). Cependant, ces résultats sont controversés. En effet, la détection de virus de la rougeole chez les patients atteints de MC par des techniques de PCR et de RT-PCR s'est révélée être négative (Afzal *et al.*, 1998; Iizuka *et al.*, 1995).





Une étude récente a mis en évidence le rôle possible et discret d'un agent viral dans l'étiologie de la MC. Lors d'une étude antérieure, ils avaient observé chez les souris ATG16L1<sup>HM</sup>, présentant un défaut d'expression d'*ATG16L1*, qu'il existait des anomalies des cellules de Paneth (Cadwell *et al.*, 2008). Des anomalies identiques sont retrouvées chez des patients atteints de MC présentant le polymorphisme à risque du gène *ATG16L1*. Chez les souris ATG16L1<sup>HM</sup>, ces anomalies apparaissent seulement chez celles ayant été en contact avec une souche de norovirus particulière (CR6) (Cadwell *et al.*, 2010). Cela suggère que des infections virales pourraient conduire à révéler un phénotype cryptique associé à un polymorphisme à risque de la MC. Ainsi, il pourrait exister des interactions complexes entre gènes de susceptibilité, virus et autres facteurs infectieux ou environnementaux menant à la survenue de la MC.

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



### III-2- Implication de *Candida albicans*

De nombreuses études montrant que les ASCA sont un bon marqueur de la MC, mais le facteur immunogène induisant leur production est encore discuté. Il a été proposé que *Candida albicans* pouvait agir comme pathogène intestinal, entraînant la formation d'ASCA (Standaert-Vitse *et al.*, 2006). Bien qu'étant un pathogène fongique, *C. albicans* peut être porté sans symptômes par une grande partie de la population en colonisant la surface muqueuse du tube digestif. *C. albicans* exprime l'épitope majeur d'ASCA sur de nombreuses molécules de surface et notamment lors de la phase pathogénique. De plus, il a été montré que *C. albicans* est capable d'aggraver une colite induite au DSS dans un modèle murin Balb/cJ, en induisant notamment une augmentation de la production de TNF- $\alpha$  (Jawhara and Poulain, 2007).

Il a été identifié un sous-groupe de patients de MC caractérisé par des ASCA positifs et une mutation dans le gène MBL (Mannan binding lectin) (Seibold *et al.*, 2004; Seibold *et al.*, 2007). MBL est un composé du système immunitaire inné qui joue un rôle important dans la défense contre les antigènes contenant du mannose, incluant les résidus mannoses répétés présents sur les levures. Les variations de la protéine MBL entraîneraient une accumulation persistante d'antigènes dans la muqueuse intestinale, stimulant ainsi une réponse immunitaire spécifique.

Les patients atteints de MC et les membres de leurs familles (non atteints) présentent une colonisation du tube digestif par *C. albicans* plus importante que la population générale (respectivement 44% et 38% contre 22% pour la population générale) (Standaert-Vitse *et al.*, 2009). Cette colonisation pourrait être influencée par les habitudes alimentaires et l'hygiène de vie, décrites pour influencer la colonisation des muqueuses par *C. albicans* (Grimoud *et al.*, 2003; Samaranyake *et al.*, 1986). De plus, la voie de différenciation lymphocytaire Th17, qui est un élément important dans la physiopathologie de la MC, est activée lors d'une infection par *C. albicans*, et elle est cruciale pour contrôler la colonisation par cette levure, que ce soit en modèle murin ou chez l'Homme (Kisand *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2009). L'implication de cette levure dans certaines formes de MC reste donc à définir, mais des facteurs environnementaux agissant sur un hôte génétiquement prédisposé pourraient favoriser la persistance de *C. albicans* et ainsi mener à une réponse immunitaire anormale de type Th17.



### III-3- Implication d'une bactérie pathogène

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

#### III-3-1- *Helicobacter*

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

Les études réalisées au cours de ces dix dernières années en modèle murin ont montré une implication directe de *Helicobacter* dans une inflammation intestinale. *Helicobacter hepaticus* est un pathogène murin proche du pathogène humain *H. pylori*. Il est impliqué dans des hépatites chez la souris et certaines souches seraient associées au développement de cancers hépatiques. Dans certains modèles murins présentant des altérations génétiques, il a été identifié comme pathogène intestinal capable d'induire une inflammation sévère, accompagnée d'une réponse immunitaire semblable à ce qui peut être observé chez des patients atteints de MC (Chin *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2002; Shomer *et al.*, 1997). Cependant, plusieurs études montrent que la présence d'une flore endogène est très importante pour qu'une inflammation intestinale se développe après une infection par *H. hepaticus* (Burich *et al.*, 2001; Kullberg *et al.*, 1998). *Helicobacter bilis* s'est aussi avéré capable d'induire une colite chez des souris immunodéficientes C3h/HeN en conditions gnotobiotiques (Jergens *et*



*al.*, 2007). La colonisation de ces souris par *H. bilis* entraîne une perturbation de la réponse immunitaire de l'hôte à sa flore commensale, induit progressivement une réponse immunitaire aux bactéries commensales, ce qui contribue au développement d'une inflammation intestinale, avec l'apparition d'une iléocolite. A l'heure actuelle, toutes ces études expérimentales sur modèle murin indiquent qu'il est indispensable de penser à une telle piste infectieuse chez les patients atteints de MC.

### III-3-2- Les bactéries psychotropes : *Yersinia* et *Listeria*

L'hypothèse de la chaîne du froid pourrait suggérer l'implication de facteurs infectieux qui seraient les bactéries psychotropes telles que *Yersinia* ou *Listeria* (Hugot *et al.*, 2003). Ces bactéries sont fréquemment retrouvées dans une grande variété d'aliments, y compris la viande et les légumes, et ont été isolées au niveau de lésions chez des patients atteints de MC.

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

La bactérie psychotrope *Listeria* fait l'objet de nombreuses recherches concernant son implication dans la pathogenèse de la MC (Chen *et al.*, 2000; Huijsdens *et al.*, 2003). *Listeria monocytogenes* pourrait représenter un bon candidat impliqué dans l'étiologie de la MC car de



**Tableau 6 : Arguments pour ou contre l'implication de *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) dans la maladie de Crohn** (d'après Pineton de Chambrun *et al.*, 2008; Sartor, 2005).

---

**Pour**

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

---

**Contre**

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

l'ADN de *L. monocytogenes* a déjà été détecté au niveau intestinal, que ce soit chez les patients présentant ou non une MC. *L. monocytogenes* a été identifié au niveau de lésions de patients atteints de MC par analyses immunohistochimiques (Chen *et al.*, 2000; Chiba *et al.*, 1998a; Liu *et al.*, 1995). Un autre point en faveur de cette hypothèse est que des souris déficientes pour NOD2, gène de susceptibilité associé à la MC, ont montré une susceptibilité accrue à une infection orale à *Listeria monocytogenes*, mais sont résistantes à une infection systémique (Kobayashi *et al.*, 2005). Cette observation est associée à une diminution des taux d'ARNm de cryptidines spécifiques, homologues aux  $\alpha$ -défensines humaines, au niveau des cellules de Paneth. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ou infirmer l'hypothèse d'une implication de *Listeria* dans la MC.

### III-3-3- *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis

L'hypothèse d'une mycobactérie à l'origine de la MC a été suspectée dès la description anatomopathologique des lésions granulomateuses (Dalziel, 1989). *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) est l'agent causal de la maladie de Johne, une iléite granulomateuse chronique des ruminants qui partage des similitudes avec la MC (Chiodini, 1989; Greenstein, 2003).

MAP est capable de survivre en macrophages en créant une niche de réplication qui met cette bactérie à l'abri des agents bactéricides du phagocyte. Cette propriété de résistance en macrophages fait de ce pathogène un candidat potentiel qui pourrait être impliqué dans la formation de granulomes, caractéristique histologique de certaines formes de MC. D'ailleurs, de l'ADN de MAP a été détecté par PCR dans des tissus de certains patients atteints de MC, notamment dans les granulomes. Cependant, l'ADN d'autres types de bactéries a également été retrouvé au niveau de ces granulomes, dont notamment *E. coli* (Ryan *et al.*, 2004). De plus, la présence d'ADN bactérien dans les granulomes n'indique pas forcément une relation de cause à effet. Cela pourrait influencer la progression de la maladie étant donné que l'ADN bactérien peut avoir un effet d'immunomodulation.

Les résultats sont contradictoires en ce qui concerne l'isolement de cette bactérie chez les patients atteints de MC (**Tableau 6**) (Pineton de Chambrun *et al.*, 2008; Sartor, 2005). Certaines études ayant pour but d'isoler des MAP ou d'amplifier des séquences d'ADN spécifiques de MAP indiquent la présence de MAP dans des biopsies intestinales de patients atteints de MC (Autschbach *et al.*, 2005; Naser *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2005; Ryan *et al.*,



2002; Sechi *et al.*, 2005b) alors que d'autres études, n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de cette bactérie (Ellingson *et al.*, 2003; Freeman and Noble, 2005; Parrish *et al.*, 2009; Shanahan and O'Mahony, 2005). Toutefois, une méta-analyse prenant en compte les tests PCR ou ELISA afin de compiler tous les résultats d'études recherchant la présence de MAP chez les patients atteints de MC démontre une association entre la détection de MAP et la MC (Feller *et al.*, 2007).

Certains gènes de susceptibilité à la MC identifiés (*TNFSF15*, *NOD2*, *IRGM*) sont également des gènes de susceptibilité à des maladies causées par les mycobactéries, suggérant un défaut de prise en charge des mycobactéries dans l'étiologie de la MC (Che *et al.*, 2010; Intemann *et al.*, 2009; Sechi *et al.*, 2005a; Zhang *et al.*, 2009). De plus, il a été montré que des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> avec un phénotype Th1 ou Th1/Th17, isolés de biopsies intestinales de patients atteints de MC sont activés par des épitopes de MAP, suggérant un rôle de MAP dans l'inflammation associée à la MC (Olsen *et al.*, 2009).

Plusieurs études cliniques ont rapporté que l'administration d'une combinaison de trois ou quatre antibiotiques présentant de fortes activités contre les mycobactéries permet d'obtenir des rémissions chez environ deux tiers à trois quarts des patients avec des formes actives de MC (Borody *et al.*, 2002; Borody *et al.*, 2007; Gui *et al.*, 1997). Toutefois, il est à noter que ces antibiotiques visant à éliminer les mycobactéries sont également actifs sur de très nombreuses espèces bactériennes. Lors d'une étude clinique testant l'efficacité d'antibiotiques anti-mycobactériens tels que la clarithromycine, rifabutine et clofazimine, dans le traitement de patients présentant une MC active (Selby *et al.*, 2007), il a été observé, après 2 ans de traitement, aucune différence entre le groupe thérapeutique et le groupe placebo concernant la récurrences de MC. Ainsi, MAP ne jouerait pas un rôle primordial dans la MC. Cependant, cette étude montre aussi qu'au bout de 6 mois, 66% des patients ayant reçu le traitement étaient en complète rémission, ce qui est le meilleur résultat obtenu à ce jour quelque soit la thérapie utilisée, Infliximab compris (Selby *et al.*, 2007).

La présence d'anticorps dirigés contre MAP a été mise en évidence chez 90% des patients atteints de MC pour lesquels la recherche d'ASCA était négative (Naser *et al.*, 2000), ce qui suggérerait l'existence de différentes formes de MC : une forme iléale avec présence d'ASCA, et au moins une autre forme pouvant être liée à la présence de MAP.

**Tableau 7 : Etudes mettant en évidence l'augmentation de souches de *Escherichia coli* associées à la muqueuse de patients atteints de maladie de Crohn.**

Auteurs (Pays)	Années	Résultats majeurs
Swidsinski <i>et al.</i> (Allemagne)	2002	<i>E. coli</i> dans les biopsies d'environ 20% des patients atteints de MC (n=54) et de 5% des contrôles (n=40).
Neut <i>et al.</i> (France)	2002	Augmentation de 100 à 1000 fois du nombre de <i>E. coli</i> totaux isolés de la muqueuse des patients atteints de MC.
Martin <i>et al.</i> (Grande-Bretagne)	2004	<i>E. coli</i> associées à la muqueuse chez 43% des patients atteints de MC (n=14) et 17% des contrôles (n=24). <i>E. coli</i> intra-mucosales chez 29% des patients atteints de MC et 9% des contrôles.
Darfeuille-Michaud <i>et al.</i> (France)	2004	<i>E. coli</i> adhérentes et invasives au niveau de 36,4% des lésions précoces de la muqueuse iléale de patients atteints de MC (n=63) par rapport à 6,2% chez les contrôles (n=16).
Mylonaki <i>et al.</i> (Grande-Bretagne)	2005	Nombre de <i>E. coli</i> associées à l'épithélium rectal chez des patients atteints de MC (n=6) significativement supérieur à celui observé chez des contrôles (n=14)
Conte <i>et al.</i> (Italie)	2006	ADN de <i>E. coli</i> au niveau de la muqueuse iléale chez 75% d'enfants atteints de MC (n=12) et chez 25% des témoins (n=7).
Kotlowski <i>et al.</i> (Canada)	2007	Augmentation de 1000 à 10000 fois du nombre de <i>E. coli</i> totaux isolés de la muqueuse des patients atteints de MC (n=13) par rapport aux contrôles (n=15). Détection de 61,5% de souches de <i>E. coli</i> des groupes phylogénétiques B2 et D (groupes « pathogènes ») parmi les souches de <i>E. coli</i> identifiées dans les biopsies de patients atteints de MC, contre seulement 26,7% chez les contrôles.
Sasaki <i>et al.</i> (USA)	2007	24,6% et 13,8% de souches bactériennes invasives chez les patients atteints de MC (n=15) et les contrôles (n=12), respectivement. Les souches de <i>E. coli</i> invasives représentent 98,9% de toutes les souches bactériennes invasives isolées de la muqueuse de patients atteints de MC contre seulement 2,1% chez les contrôles.
Baumgart <i>et al.</i> (USA)	2007	<i>E. coli</i> adhérentes et invasives au niveau de 38,5% des lésions de la muqueuse iléale de patients atteints de MC (n=13) et de 37,5 % des lésions coliques (n=8) par rapport à 14% chez les contrôles (n=7).
Martinez-Medina <i>et al.</i> (Espagne)	2009	<i>E. coli</i> adhérentes et invasives associées à la muqueuse chez 51,9% des patients atteints de MC (n=20) et 16,7% des contrôles (n=28). Prévalence importante du groupe phylogénétique B2 parmi ces AIEC (64%).

### III-3-4- *Escherichia coli*

L'implication de *E. coli* dans la MC est envisagée depuis longtemps, basée notamment sur des études sérologiques (Landers *et al.*, 2002; Macpherson *et al.*, 1996; Mei *et al.*, 2006; Mow *et al.*, 2004a; Mow *et al.*, 2004b; Tabaqchali *et al.*, 1978). Par ailleurs, de nombreuses études sur des biopsies intestinales de patients atteints de MC ont mis en évidence la présence d'antigènes spécifiques de *E. coli*, notamment au niveau des macrophages et des cellules géantes à la base des ulcères, le long des fissures, dans les granulomes et la lamina propria (Cartun *et al.*, 1993; Fujita *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1995; Swidsinski *et al.*, 2002). Un nombre plus important de *E. coli* pathogènes des groupes B2 et D est retrouvé chez les patients atteints de MICI par rapport à des contrôles (Kotlowski *et al.*, 2007). De plus, des souches de *E. coli* ont été isolées plus fréquemment à partir de séreuses intestinales et de ganglions mésentériques prélevés lors d'actes chirurgicaux chez les patients atteints de MC que chez les contrôles (Ambrose *et al.*, 1984; Laffineur *et al.*, 1992). *E. coli* colonise anormalement les lésions iléales aiguës et chroniques des patients atteints de MC (représentant jusqu'à 100% de la flore totale aéro-anaérobie) comparativement aux témoins (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998). Plusieurs études indépendantes ont rapporté une augmentation du nombre de *E. coli* associés à la muqueuse intestinale chez les patients atteints de MC (**Tableau 7**) (Baumgart *et al.*, 2007; Conte *et al.*, 2006; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Kotlowski *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2004; Martinez-Medina *et al.*, 2009a; Neut *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2007; Swidsinski *et al.*, 2002).

#### III-3-4-1- Propriétés d'adhésion des souches de *Escherichia coli* associées à la maladie de Crohn

Les souches de *E. coli* retrouvées au niveau de la muqueuse intestinale ou dans des selles de patients atteints de MC sont capables d'adhérer *in vitro* aux cellules eucaryotes. En effet, des souches de *E. coli* présentant des propriétés d'adhésion aux cellules buccales ont été isolées des selles de 62% et 53% de patients atteints de MC, contre respectivement 6% et 5% de sujets contrôles (Burke and Axon, 1988; Giaffer *et al.*, 1992). De plus, des souches de *E. coli* possédant des gènes codant des adhésines responsables chez *E. coli* d'une adhésion uniforme des bactéries à la surface des cellules (adhésion diffuse) ont été retrouvées au niveau



de 39,3% des biopsies rectales de patients avec MC, comparativement à 22,2% des biopsies provenant de sujets contrôles (Schultsz *et al.*, 1997).

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

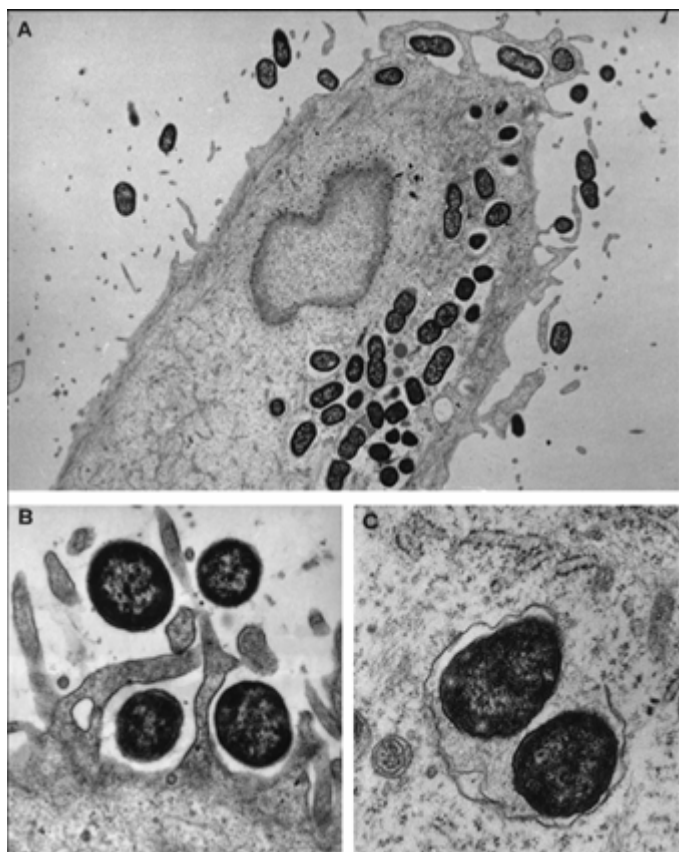
#### III-3-4-2- Propriétés d'invasion des souches de *Escherichia coli* associées à la maladie de Crohn

Plusieurs études indépendantes ont rapporté chez les patients atteints de MC la présence de *E. coli* internalisés dans la muqueuse ou la capacité des *E. coli* associés à la muqueuse d'envahir les cellules épithéliales intestinales (Conte *et al.*, 2006; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Kotlowski *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2007)

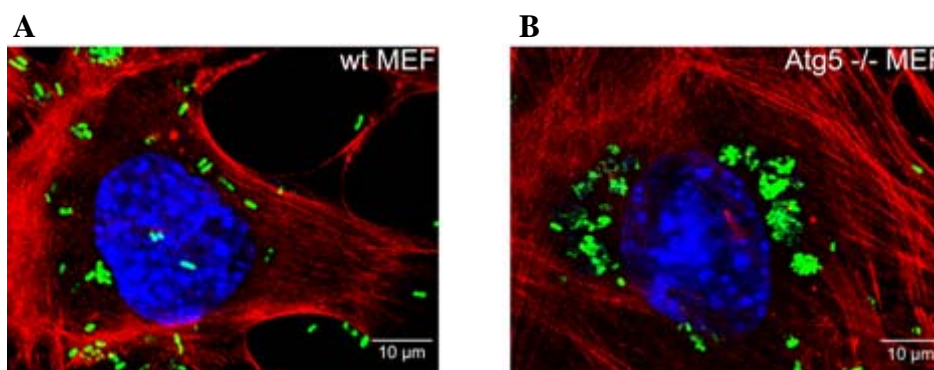
La souche de *E. coli* LF82, isolée au niveau d'une lésion iléale chronique chez un patient atteint de MC (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004), a plus particulièrement été étudiée au laboratoire. Cette souche est capable d'envahir *in vitro* les cellules épithéliales intestinales Intestine-407, Caco-2 et HCT-8, ainsi que les cellules épithéliales de larynx HEp-2, et ceci avec un niveau d'internalisation comparable à celui des *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), pathovar de référence de *E. coli* pour le phénotype invasif et très proche de *Shigella* spp. (Boudeau *et al.*, 1999).

L'interaction entre la souche LF82 et les cellules épithéliales est caractérisée par l'émission d'élongations membranaires à la surface des cellules cibles qui englobent les bactéries adhérentes. Ces élongations, localisées au site de contact intime avec les bactéries, semblent être sous-tendues par une accumulation d'éléments du cytosquelette cellulaire, comme en témoignent les zones cytoplasmiques denses observées au niveau des sites d'interaction (**Figure 31**). Ce phénomène d'internalisation de la souche LF82 dans les cellules HEp-2 nécessite une polymérisation active d'actine, ainsi qu'un recrutement des microtubules, comme ont pu le montrer les inhibitions d'invasion en utilisant la cytochalasine D et la colchicine, inhibiteurs spécifiques de ces deux mécanismes. De telles modifications morphologiques ont également été observées lors des phénomènes de macropinocytose





**Figure 31 : Clichés de microscopie électronique à transmission de cellules épithéliales HEp-2 infectées par la souche de *E. coli* LF82.** **A.** Adhésion et invasion des bactéries LF82 à la cellule hôte ( $\times 6\ 200$ ). **B.** Formation d'extensions membranaires par la cellule hôte infectée qui englobent les bactéries adhérentes en vue de leur internalisation ( $\times 21\ 600$ ). **C.** Lyse de la vacuole d'endocytose contenant les bactéries LF82 ( $\times 28\ 800$ ) (Boudeau *et al.*, 1999).



**Figure 32 : Autophagie et contrôle intracellulaire de la bactérie LF82.** Une altération du mécanisme de l'autophagie suite à la délétion du gène *Atg5* (**B**) conduit à un défaut de prise en charge des bactéries intracellulaires, avec une augmentation de leur réplique intracellulaire comparativement aux fibroblastes sauvages (**A**) (Lapaquette *et al.*, 2009).

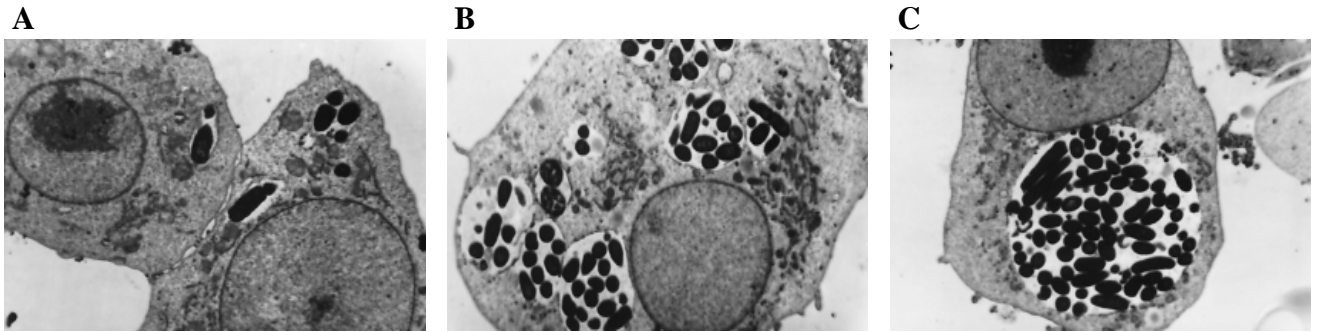
induits par *Shigella* spp. ou *Salmonella* spp. (Adam *et al.*, 1995; Finlay and Falkow, 1988; Francis *et al.*, 1993). Cependant, aucun des déterminants génétiques d'invasion connus chez *Shigella* spp., *Salmonella* spp. ou chez les *E. coli* pathogènes n'a été retrouvé chez la souche LF82 (Boudeau *et al.*, 1999).

Comme d'autres souches invasives du type EIEC, *Shigella* spp. ou *Salmonella* spp., la souche LF82 est capable de survivre mais aussi de se multiplier dans les cellules intestinales. L'analyse en microscopie électronique à transmission a montré que la souche LF82 avait la capacité, comme *Shigella* spp., de lyser la membrane de la vacuole d'endocytose (**Figure 31**) et de se retrouver libre dans le cytoplasme, environnement favorable à une multiplication bactérienne (Boudeau *et al.*, 1999).

### III-3-4-3- Survie et multiplication en cellules épithéliales

La colonisation iléale par des souches de *E. coli* adhérentes et invasives et l'association à la MC des polymorphismes ATG16L1 et IRGM suggèrent qu'une altération de l'autophagie pourrait jouer un rôle important dans l'immunopathogenèse de la MC. Dans des fibroblastes murins déficients pour l'autophagie, la souche de référence LF82 se multiplie plus intensément que dans des fibroblastes normaux (**Figure 32**) (Lapaquette *et al.*, 2009). Ce comportement intracellulaire n'est pas retrouvé pour les souches d'*E. coli* commensaux ou entéropathogènes, semblant indiquer une prise en charge spécifique par l'autophagie des souches de *E. coli* associées à la MC. Par ailleurs ce processus cellulaire est induit par les cellules en réponse à l'infection et une partie des bactéries internalisées est retrouvée dans des autophagosomes où leur multiplication est contrôlée. Une extinction de l'expression des gènes *ATG16L1* et *IRGM* permet à la souche LF82 une réplication intracellulaire importante (Lapaquette *et al.*, 2009). De plus il a récemment été montré que des cellules présentant le polymorphisme silencieux (C313T) localisé dans la séquence codante du gène *IRGM* perdaient la régulation de l'expression de ce gène via les microARN miR-196 A et B, engendrant une persistance accrue des souches de *E. coli* associées à la MC intracellulaires (Brest *et al.*, 2011b).

Ces données suggèrent qu'un dysfonctionnement de l'autophagie chez des patients serait favorable à la persistance de bactéries, pouvant conduire à une réponse immunitaire exacerbée caractéristique de la pathologie (Brest *et al.*, 2011b; Lapaquette *et al.*, 2009).



**Figure 33 : Clichés de microscopie électronique à transmission de macrophages J774-A1 infectés par la souche de *E. coli* LF82. A.** Après 1 h d'infection, les bactéries LF82 sont internalisées dans un phagosome. **B.** Les bactéries LF82 sont capables de se multiplier, et à 8 h post-infection des vacuoles contenant plusieurs bactéries sont observées. **C.** A 24 h post-infection, les bactéries LF82 se retrouvent dans une large et unique vacuole ( $\times 7\ 200$ ) (Glasser *et al.*, 2001).

### III-3-4-4- Survie et multiplication des souches de *Escherichia coli* associées à la maladie de Crohn en macrophages

Le comportement des souches de *E. coli* associées à la MC, ainsi que le devenir de la cellule hôte, ont été étudiés dans différentes cellules macrophagiques murines et humaines (Glasser *et al.*, 2001). Les résultats obtenus montrent que 100% des souches de *E. coli* isolées de patients atteints de MC sont capables, après phagocytose par les macrophages murins J774, de survivre et de se multiplier fortement jusqu'à 48 h post-infection, avec un nombre de bactéries intracellulaires à 48 h post-infection pouvant atteindre 72 fois le nombre de bactéries internalisées à 1 h. De plus, la souche LF82 est capable de résister à l'activité bactéricide des cellules macrophagiques J774 pendant au moins 5 jours (Glasser *et al.*, 2001).

Les clichés obtenus en microscopie électronique à transmission montrent que les bactéries LF82 induisent la formation d'une large vacuole à 24 h post-infection, par fusion de vacuoles précoces tout en préservant l'intégrité de la cellule hôte (**Figure 33**). Aucune bactérie libre dans le cytoplasme n'a été observée. La détermination du taux de lactate déshydrogénase (enzyme cytoplasmique), un marquage par de l'annexine V ainsi que l'analyse de la fragmentation de l'ADN montrent que, contrairement à *Shigella* spp. ou *Salmonella* spp., la souche LF82 n'induit aucune mort cellulaire des macrophages infectés, par apoptose ou par nécrose. Les macrophages infectés par la souche LF82 sécrètent des taux élevés de TNF- $\alpha$  (Glasser *et al.*, 2001).

L'analyse du trafic intracellulaire des phagosomes contenant les bactéries LF82 en macrophages a montré que ceux-ci transitent normalement le long de la voie endocyttaire (Bringer *et al.*, 2006). En effet, contrairement à de nombreuses bactéries pathogènes qui échappent à la maturation phagosomale normale (Meresse *et al.*, 1999), les bactéries LF82 sont internalisées dans des phagosomes qui évoluent vers un compartiment de type phagolysosomal acide et contenant de la cathepsine D active. Les mécanismes par lesquels les bactéries LF82 résistent à l'activité hydrolytique de la cathepsine D sont encore inconnus. La neutralisation du pH intravacuolaire des phagosomes contenant les bactéries LF82 avec des agents lysomotropiques alcalinisants, tels que la chloroquine ou le chlorure d'ammonium, inhibe la réplication intracellulaire des bactéries indiquant que le pH vacuolaire acide constitue un signal clé impliqué dans la régulation de gènes de virulence nécessaires à la survie/multiplication des bactéries LF82 en macrophages (Bringer *et al.*, 2006).

Le criblage d'une banque de mutants d'insertion Tn5phoA en macrophages murins J774-A1 a permis d'identifier le rôle de la protéine de stress HtrA dans la réplication de la

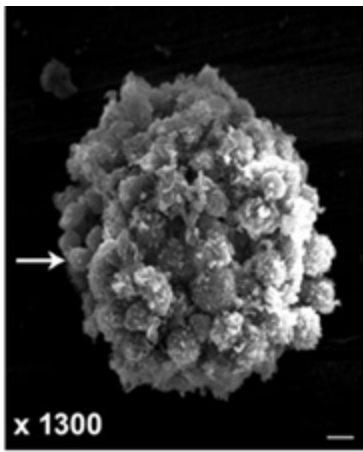


souche LF82 en macrophages (Bringer *et al.*, 2005) et de l'oxydoréductase périplasmique DsbA dans le processus de survie de la souche LF82 en macrophages (Bringer *et al.*, 2007). La croissance du mutant isogénique LF82- $\Delta$ *htrA* est significativement diminuée dans un milieu reproduisant en partie le contenu d'une vacuole de phagocytose de par un pH acide (pH 5,5) et un appauvrissement en nutriments, et ce mutant isogénique est fortement affecté dans son pouvoir de réplication intramacrophagiques (Bringer *et al.*, 2005). La délétion du gène *dsbA* chez la souche LF82 conduit quant-à elle à l'absence de synthèse de flagelles et de pili de type 1 fonctionnels à la surface de la bactérie (Bringer *et al.*, 2007). La protéine DsbA joue également un rôle indispensable dans le processus de survie et de multiplication en macrophages, probablement via la maturation de facteur(s) de virulence qui restent à être identifiés.

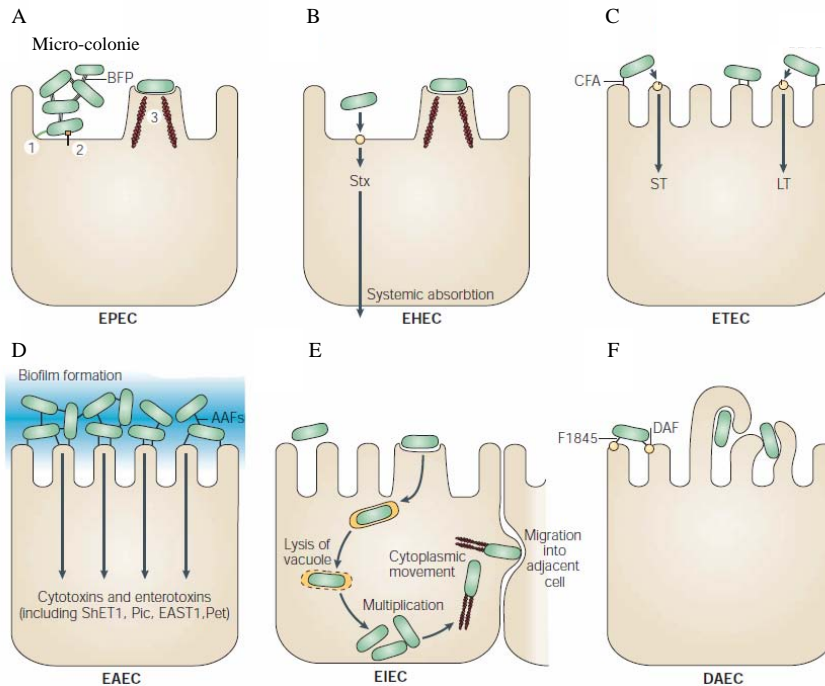
Il a récemment été montré que la forte sécrétion de TNF- $\alpha$  induite par la réplication intramacrophagique de la souche LF82 était nécessaire pour que cette réplication intramacrophagique soit maximale (Bringer *et al.*, 2011). Il semble ainsi exister une boucle d'amplification au cours de laquelle les bactéries LF82, en induisant la sécrétion de TNF- $\alpha$ , entraînent une augmentation de leur pouvoir répliatif. Enfin, il a pu être montré que la machinerie autophagique était recrutée au site d'entrée des bactéries lors de l'infection de macrophages, et que ce processus autophagique était nécessaire pour limiter la réplication intramacrophagiques des souches de *E. coli* adhérentes et invasives, mais également pour la mise en place de la réponse inflammatoire (Lapaquette *et al.*, 2011).

### III-3-4-5- Souches de *Escherichia coli* associées à la maladie de Crohn et formation de granulomes

La présence de granulomes épithélioïdes constitue l'une des caractéristiques histologiques de la MC. Plusieurs études viennent appuyer l'hypothèse de l'implication de *E. coli* dans la formation des granulomes. En effet, des antigènes et de l'ADN de *E. coli* ont été retrouvés dans les granulomes de patients atteints de MC (Cartun *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995; Ryan *et al.*, 2004) et il a de plus été mis en évidence la présence systématique de *E. coli* ou d'antigènes de *E. coli* dans les granulomes des chiens Boxer atteints de colites granulomateuses (Van Kruiningen *et al.*, 2005). Ces souches de *E. coli* ont la capacité d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales en culture et la capacité de survivre et de se



**Figure 34 : Cliché de microscopie électronique à balayage d'une structure granulomateuse induite *in vitro* par la souche AIEC LF82. Les agrégats contiennent à la fois des lymphocytes (indiqués par la flèche) et des macrophages (Meconi *et al.*, 2007).**



**Figure 35 : Les 6 classes de *E. coli* responsables de diarrhées. A.** Les EPEC adhèrent aux cellules épithéliales intestinales et détruisent l'architecture des microvillosités en entraînant des lésions d'attachement-effacement caractéristiques. La perturbation du cytosquelette est accompagnée d'une réponse inflammatoire et de diarrhées. La bactérie adhère initialement grâce aux BFP (Bundle-Forming Pilus) puis il y a translocation d'effecteurs par le système de sécrétion de type III qui induisent la formation d'un piédestal. **B.** Les EHEC entraînent également la formation de lésions d'attachement-effacement. Les EHEC produisent des Shiga-like toxines (Stx) se disséminant dans l'organisme par la circulation sanguine. **C.** Les ETEC adhèrent aux cellules épithéliales intestinales grâce aux facteurs CFA (Colonization Factor Antigen) et provoquent des diarrhées aqueuses suite à la sécrétion d'entérotoxines thermolabile (LT) et thermostable (ST). **D.** Les EAEC adhèrent aux cellules sous forme d'un fin biofilm grâce aux facteurs AAF (Aggregative Adherence Fimbriae) et sécrètent des entérotoxines et des cytotoxines. **E.** Les EIEC envahissent les cellules, lysent leur vacuole d'internalisation et se déplacent à l'intérieur de la cellule infectée et peuvent pénétrer dans les cellules adjacentes en utilisant les microfilaments d'actine. **F.** Les DAEC adhèrent aux cellules suite à une interaction notamment entre l'adhésine F1845 et le récepteur DAF (Decay-Accelerating Factor) induisant un signal de transduction conduisant à un allongement des microvillosités suite à une désorganisation massive du cytosquelette (Kaper *et al.*, 2005).

multiplier dans les macrophages de façon similaire aux souches de *E. coli* associées à la MC (Simpson *et al.*, 2006).

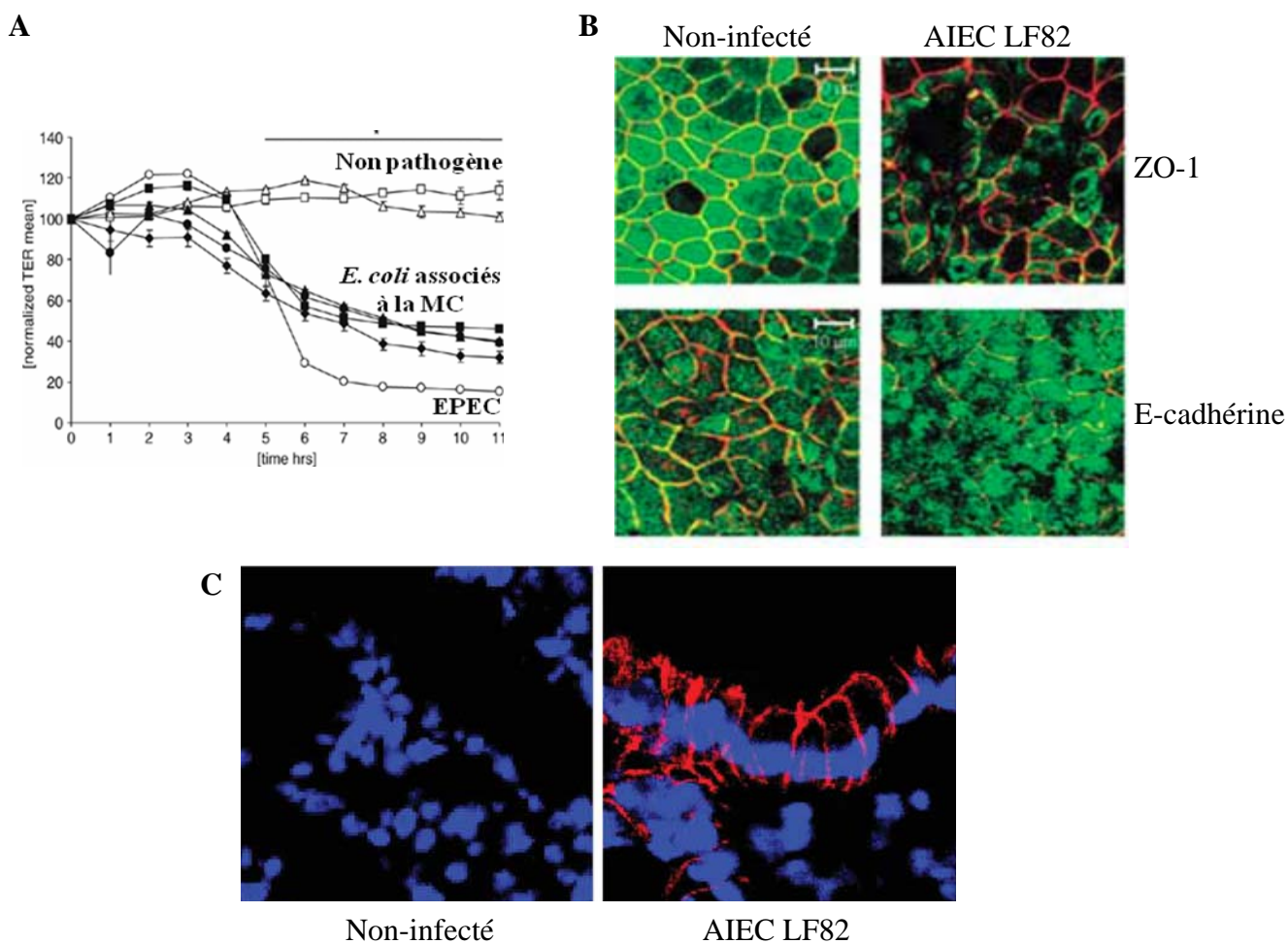
La souche LF82 induit la formation de granulomes *in vitro* (Meconi *et al.*, 2007), comme montré par l'induction d'agrégations de macrophages humains infectés puis le recrutement de lymphocytes « circulants » et la formation de cellules géantes multinuclées au sein de ces agrégats. Les agrégats ainsi formés ressemblent fortement aux granulomes associés à la MC, dont la plupart sont constitués de macrophages, de lymphocytes et de cellules géantes multinuclées (**Figure 34**). Des extraits totaux de bactéries LF82 seuls sont également capables d'induire la formation de ces granulomes, alors que ni des souches vivantes de *E. coli* non pathogènes ni des extraits totaux de ces souches n'induisent la formation d'agrégats, indiquant donc la présence chez la souche LF82 d'antigènes spécifiques impliqués dans la formation des granulomes.

#### III-3-4-6- Définition du pathovar AIEC et prévalence

Jusqu'à présent, six groupes pathogènes ou pathovars de *E. coli* responsables de syndromes diarrhéiques ont été distingués sur la base de la nature de leurs facteurs de virulence et des manifestations qu'ils engendrent. Il s'agit des *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), des *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), des *E. coli* entéro-agrégatifs (EAEC), des *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC), des *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) et des *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) (**Figure 35**, pour revue, Kaper, 2005). Ces souches pathogènes de *E. coli* codent des facteurs d'adhésion spécifiques leur permettant de coloniser le tractus intestinal ainsi que des toxines ou des protéines sécrétées capables d'affecter un certain nombre de fonctions eucaryotes.

Les recherches par amplification génique et par hybridation moléculaire de différents déterminants génétiques d'adhésion connus chez les *E. coli* responsables de diarrhées et d'infections urinaires ont montré que 73% des souches de *E. coli* adhérentes et invasives associées à la MC ne possèdent aucun des facteurs d'adhésion et d'invasion déjà décrits chez les souches de *E. coli* pathogènes responsables d'infections intestinales (Boudeau *et al.*, 1999; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998). Sur la base des caractéristiques pathogéniques des souches de *E. coli* associées à la MC, un nouveau groupe de *E. coli* pathogènes associé à la MC a été dénommé AIEC pour Adherent-Invasive *E. coli* (Boudeau *et al.*, 1999). Les critères d'inclusion dans ce groupe sont : (i) la capacité à adhérer et envahir les cellules épithéliales





**Figure 36 : Les *E. coli* invasifs isolés de patients atteints de MC induisent une rupture de la barrière intestinale.** L'infection de cellules Caco-2 différenciées par des AIEC induit (A) une diminution de la résistance trans-épithéliale et (B) une déstabilisation des jonctions serrées visualisée par la redistribution des protéines ZO-1 et E-cadhérine (Sasaki *et al.*, 2007). C. La souche AIEC de référence LF82 est capable d'induire l'expression de la pore-forming claudin 2 (Denizot *et al.*, 2011)

**Tableau 8 : Prévalence des souches AIEC associées aux muqueuses iléale et colique de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et de sujets contrôles** (d'après Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). RCH, Rectocolite hémorragique.

	Nombre de patients	Nombre de patients hébergeant des AIEC (%)	P
<b>Biopsies iléales</b>			
Crohn « chronique »	23	5 (21,7)	0,196
Crohn « aigu »	22	8 (36,4)	<b>0,034</b>
Crohn muqueuse saine	18	4 (22,2)	0,206
Contrôles	16	1 (6,2)	-
<b>Biopsies coliques</b>			
Crohn	27	1 (3,7)	0,5
RCH	8	0 (0)	0,85
Contrôles	102	2 (1,9)	-

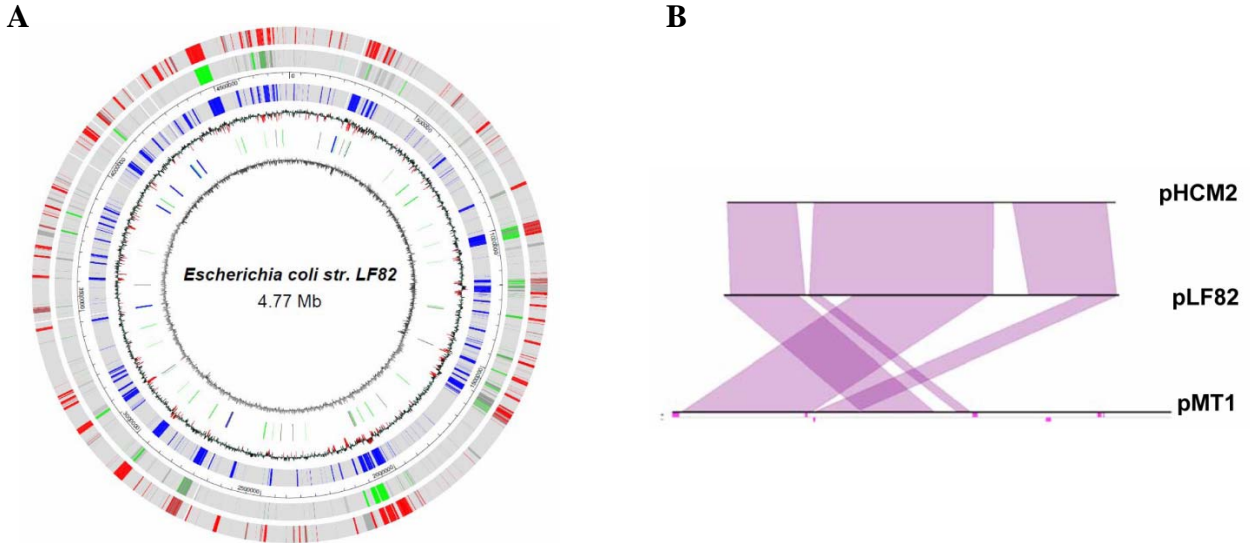
intestinales selon un processus dépendant du recrutement des microtubules et des microfilaments, (ii) la capacité à survivre et se multiplier fortement au sein de larges vacuoles dans les macrophages sans induire de mort cellulaire et (iii) la capacité à induire la libération de taux élevés de TNF- $\alpha$  par les macrophages infectés. De plus, les souches AIEC ont pour caractéristiques de pouvoir déstabiliser l'épithélium intestinal en induisant notamment l'expression de la pore-forming claudin 2 (Denizot *et al.*, 2011; Sasaki *et al.*, 2007) (**Figure 36**), de former des biofilms (Martinez-Medina *et al.*, 2009b), et d'induire la formation de granulomes (Meconi *et al.*, 2007).

Une étude de la prévalence des souches AIEC associées à la muqueuse intestinale des patients atteints de MC a indiqué que des souches AIEC sont retrouvées au niveau de la portion néotermale de l'iléon chez 36,4% des patients atteints de MC contre seulement 6,2% chez les contrôles (**Tableau 8**) (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004).

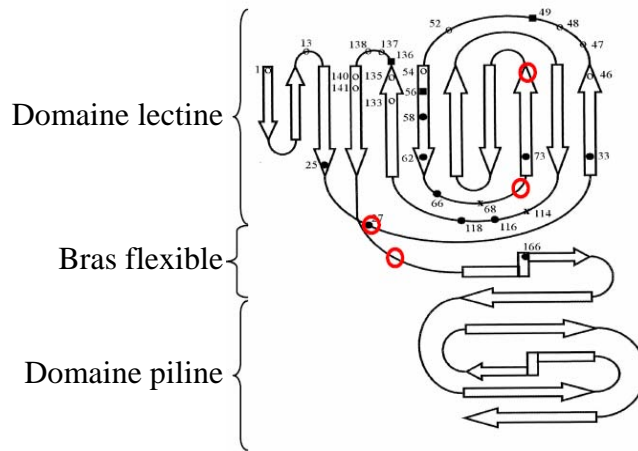
Récemment, plusieurs génomes de souches AIEC ont été séquencés, et une étude génomique comparative de souches de *E. coli* isolées de patients atteints de MC ou de RCH a permis de révéler que ces souches représentent une population hétérogène avec un profil génomique semblable aux souches de *E. coli* pathogènes extra-intestinales (ExPEC, Extra-intestinal Pathogenic *E. coli*) (Clarke *et al.*, 2011; Krause *et al.*, 2010; Miquel *et al.*, 2010; Nash *et al.*, 2010; Vejborg *et al.*, 2011). L'ensemble de ces résultats montre clairement qu'une souche unique n'est pas retrouvée chez les patients atteints de MC, mais que quelques génotypes particuliers sont plus fréquemment associés aux lésions iléales de MC (Baumgart *et al.*, 2007; Masseret *et al.*, 2001).

De manière intéressante, la majorité de ces souches appartient au groupe phylogénétique B2, groupe au sein duquel se retrouve la majorité des *E. coli* pathogènes. Pour la souche LF82, ce séquençage montre que son génome a évolué à partir de souches ExPEC du groupe phylogénétique B2 avec l'acquisition de gènes ou de groupes de gènes de *Salmonella* et de *Yersinia* (**Figure 37**). Sur la base de l'étude des gènes dit « flexibles » (gènes ne faisant pas partie du squelette génomique commun à tous les génomes séquencés de *E. coli*) et des SNP présents, la souche LF82 est phylogénétiquement proche de *E. coli* pathogène aviaire (Avian Pathogenic *E. coli* souche 01, APEC-01), de *E. coli* associé aux méningites (Meningitis-Associated *E. coli* souche S88, MNEC S88), mais aussi de *E. coli* uropathogènes (Uropathogenic *E. coli* souche UTI89, UPEC UTI89) (Miquel *et al.*, 2010).





**Figure 37 : Représentation circulaire du génome de la souche AIEC de référence LF82 et comparaison de la syntonie entre les plasmides pLF82, pHCM2 et pMT1.** **A.** Représentation circulaire du génome de la souche AIEC de référence LF82. Les différents cercles représentent, de l'intérieur à l'extérieur : (1) le pourcentage en GC, (2) la localisation des ARNt (vert), des ARNr (bleu) et des séquences d'insertion (gris), (3) l'écart à la moyenne du pourcentage de GC (les zones rouges indiquent que l'écart à la moyenne est supérieur à 2 déviation standard), (4-6) les gènes spécifiques à la souche LF82 comparativement à la souche de *E. coli* non pathogène K12 (bleu), et comparativement aux souches de *E. coli* B2 (vert) et de *E. coli* commensales (rouge). Les gènes présentant au moins un homologue dans une autre souche de *E. coli* et ayant plus de 85% d'identité sur au moins 80% de la longueur sont considérés comme non spécifiques **B.** Représentation schématique de la syntonie existante entre la séquence nucléotidique du plasmide de la souche AIEC de référence LF82 (pLF82) et celui de *Salmonella enterica* serovar Typhi (pHCM2) et de *Yersinia pestis* Pestoides (pMT1) (Miquel *et al.*, 2010).



**Figure 38 : Structure de la sous-unité FimH, adhésine des pili de type 1.** Cette sous-unité est constituée d'un domaine piline, qui permet l'ancrage dans le pilus, un domaine lectine, responsable de la reconnaissance des résidus mannose, et un bras flexible qui relie les deux domaines. En rouge sont signalées les mutations présentes chez la souche AIEC LF82 : V27A, N70S, S78N et T158P (modifiée d'après Schembri *et al.*, 2000).

### III-3-4-7- Facteurs de virulence des AIEC impliqués dans la colonisation de la muqueuse intestinale et l'invasion des cellules épithéliales intestinales

Etant donné l'absence de déterminants génétiques d'invasion connus ou génétiquement similaires à ceux de souches invasives de *E. coli*, une stratégie de recherche des déterminants génétiques impliqués dans le pouvoir d'invasion de la souche AIEC de référence LF82 a été réalisée par mutagenèse aléatoire par insertion du transposon Tn5phoA. Le criblage de la banque de mutants d'insertion Tn5phoA en cellules épithéliales intestinales Intestine-407 a permis d'identifier les pili de type 1, les flagelles et la protéine de membrane externe YfgL comme jouant un rôle dans la capacité de la souche AIEC LF82 à adhérer et à envahir les cellules épithéliales intestinales.

#### III-3-4-7-1- Les pili de type 1

Les pili de type 1, synthétisés par la majorité des Enterobacteriaceae, sont impliqués dans la pathogénicité bactérienne de par leur rôle dans l'adhésion bactérienne à différents types de cellules eucaryotes via la reconnaissance de résidus mannosides (Giampapa *et al.*, 1988; Ofek *et al.*, 1977; Sokurenko *et al.*, 1994; Tewari *et al.*, 1993; Wold *et al.*, 1990) et par leur implication dans l'invasion de souches de *E. coli* uropathogènes ou de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Baumler *et al.*, 1996b; Bower *et al.*, 2005; Horiuchi *et al.*, 1992; Martinez *et al.*, 2000; Mulvey *et al.*, 1998). Les pili de type 1 jouent un rôle clé dans l'invasion des cellules épithéliales par la souche AIEC LF82 en induisant la formation d'élongations membranaires à la surface des cellules cibles contribuant à leur internalisation (Boudeau *et al.*, 2001). Le séquençage des gènes de l'opéron *fim* de la souche AIEC LF82 a mis en évidence des variations structurales au sein de plusieurs sous-unités, et notamment au sein de l'adhésine FimH (**Figure 38**), comparativement à celles d'une souche de *E. coli* K-12 non pathogène, indiquant que la souche AIEC LF82 synthétise des pili de type 1 variants (Boudeau *et al.*, 2001). Les pili de type 1 de la souche LF82 exprimés par une souche de *E. coli* de laboratoire non invasive ne lui confèrent pas de propriétés d'invasion, indiquant que les pili de type 1 sont nécessaires mais pas suffisants pour finaliser l'internalisation bactérienne (Boudeau *et al.*, 2001).

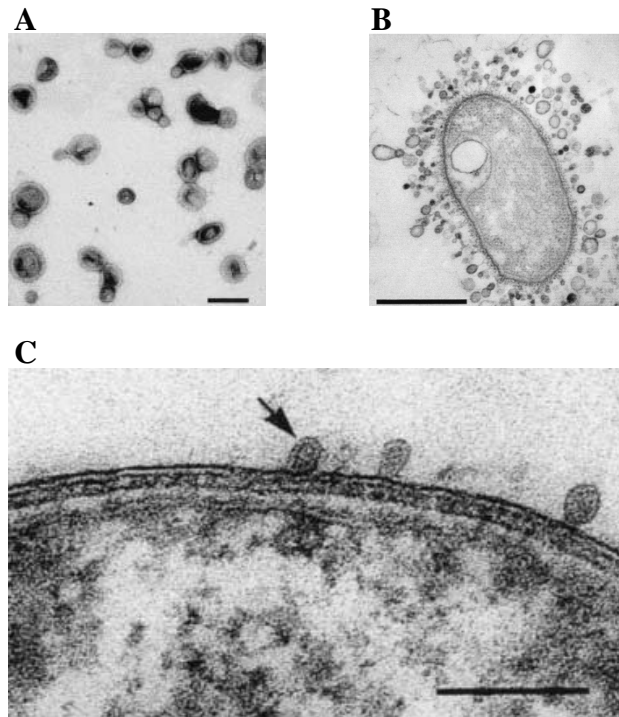


## III-3-4-7-2- Les flagelles

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

Chez la souche AIEC LF82, il a été montré qu'un mutant isogénique LF82 délété du gène *fliC* codant la flagelline FliC n'est plus capable ni d'adhérer ni d'envahir les cellules épithéliales intestinales en culture (Barnich *et al.*, 2003). D'autre part, ce mutant ne synthétise plus de pili de type 1. L'absence de production de pili de type 1 par le mutant LF82- $\Delta$ *fliC* est consécutive à l'orientation préférentielle en phase OFF de la séquence inversible localisée en amont de l'opéron *fim* et comportant la séquence promotrice de celui-ci. Ceci est la première description d'une telle co-régulation de la synthèse des pili de type 1 et des flagelles. L'étude du mécanisme moléculaire de co-régulation chez la souche AIEC LF82 a montré que le facteur sigma FliA est le composant régulateur clé contrôlant à la fois l'expression des gènes de classe III du régulon flagellaire, dont le gène *fliC*, mais également l'expression de gènes impliqués dans la voie dépendante du di-guanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP). La concentration en c-di-GMP, un second messager bactérien, permet la modulation de l'expression des pili de type 1 chez la souche AIEC LF82 (Claret *et al.*, 2007), tout comme il permet la modulation de l'expression de gènes de virulence chez d'autres bactéries pathogènes (Hisert *et al.*, 2005; Kader *et al.*, 2006; Kulasakara *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2006; Tamayo *et al.*, 2005). Une expression induite des pili de type 1 chez le mutant isogénique LF82- $\Delta$ *fliC* par transformation de ce mutant avec un plasmide recombinant codant l'opéron





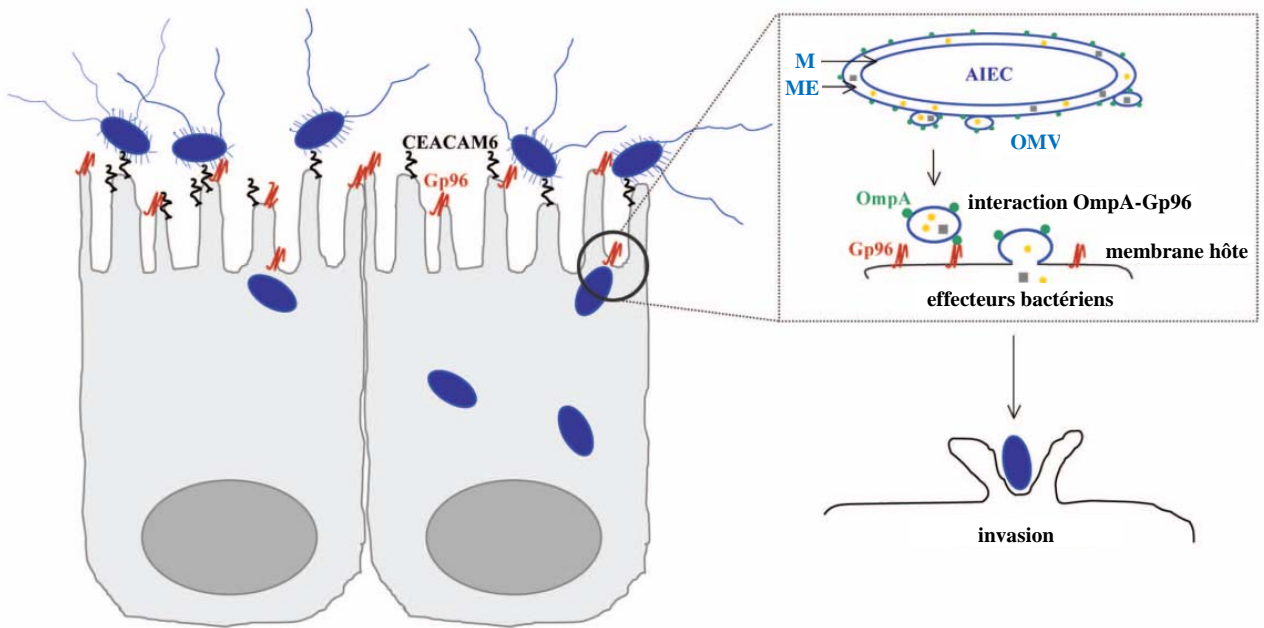
**Figure 39 : Vésicules de membrane externe (OMV).** **A.** Clichés de microscopie électronique à transmission d'OMV purifiées à partir de surnageant de culture de *Pseudomonas aeruginosa* et colorées négativement, échelle : 250nm. **B.** Coupe fine d'une bactérie à Gram négatif isolée au sein d'un biofilm de rivière et produisant des quantités importantes d'OMV, échelle : 1  $\mu$ m. **C.** Coupe fine de *P. aeruginosa* montrant le bourgeonnement de la membrane externe précédant la libération d'OMV dans le milieu extracellulaire, échelle : 250nm (Beveridge, 1999).

*fim* ne restaure pas totalement les niveaux d'adhésion et d'invasion (Barnich *et al.*, 2003). Une étape de centrifugation permet de restaurer totalement l'adhésion, mais pas l'invasion, du mutant isogénique délété du gène *fliC* chez lequel une expression de pili de type 1 a été induite. L'absence de mobilité ne permet donc pas d'expliquer à elle seule la diminution du pouvoir d'invasion observée. Les flagelles joueraient donc un rôle par eux-mêmes chez la souche AIEC LF82 dans le processus d'invasion, soit directement comme appareil de sécrétion pour des facteurs de virulence intervenant dans l'invasion, comme déjà rapporté chez *Campylobacter* spp. (Guerry, 2007), soit indirectement en contrôlant l'expression de facteurs de virulence autres que les pili de type 1.

### III-3-4-7-3- Les vésicules de membrane externe

Les vésicules de membrane externe (OMV, pour Outer Membrane Vesicles) ont pour la première fois été observées dans les années 1960. Cependant, leurs mécanismes de formation et leurs rôles biologiques sont actuellement mal connus. Les OMV sont produites par de très nombreuses bactéries à Gram négatif pathogènes ou non, avec entre autre *E. coli* (Gankema *et al.*, 1980; Hoekstra *et al.*, 1976), *Shigella* spp. (Dutta *et al.*, 2004; Kadurugamuwa and Beveridge, 1999), *Bacteroides* spp. (dont *Porphyromonas*) (Grenier and Mayrand, 1987; Zhou *et al.*, 1998) ou *Helicobacter pylori* (Fiocca *et al.*, 1999). La formation d'OMV est un processus ubiquiste des bactéries à Gram négatif observé dans différentes conditions de culture (pour revue, Beveridge, 1999), mais également lorsque les bactéries sont organisées en biofilms (Schooling and Beveridge, 2006). Ces vésicules résultent d'un bourgeonnement de la membrane externe (ME) à la surface des bactéries et sont donc constituées de LPS, de protéines de ME et de phospholipides (**Figure 39**). De plus, des protéines périplasmiques peuvent être emprisonnées dans ces vésicules lors de leur formation de manière passive mais aussi active (Kato *et al.*, 2002; Wai *et al.*, 2003; Wensink and Witholt, 1981). D'une façon générale, les vésicules constituent un moyen pour les bactéries d'interagir avec des cellules eucaryotes ou d'autres cellules procaryotes. Elles peuvent véhiculer des adhésines, des toxines, et des composés immunomodulateurs qui peuvent médier l'adhésion, causer la cytotoxicité et moduler les réponses immunes de l'hôte (pour revue, Kuehn and Kesty, 2005).

L'étude de la production d'OMV chez la souche AIEC LF82 a montré pour la première fois l'implication des OMV dans un processus d'invasion de cellules hôtes par des bactéries

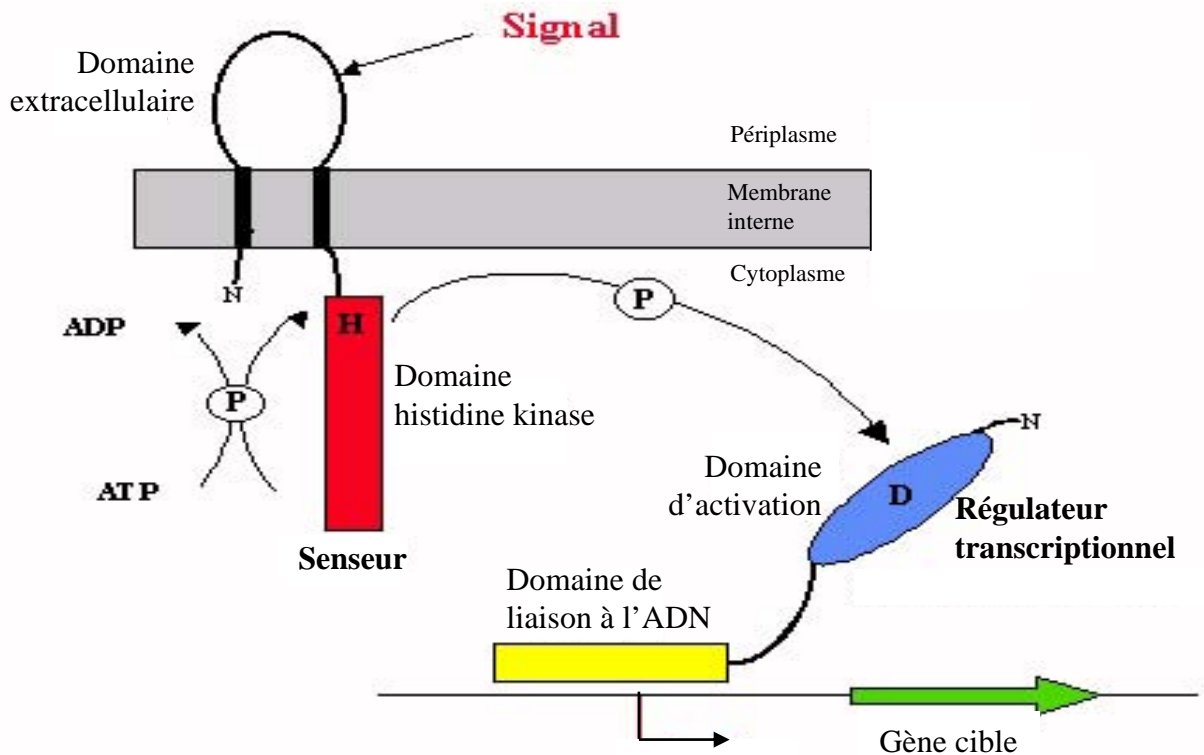


**Figure 40 : Implication du récepteur Gp96 dans le processus invasif des souches AIEC associées à la muqueuse iléale des patients atteints de MC.** Les bactéries AIEC sont capables d'adhérer aux cellules épithéliales intestinales exprimant le récepteur CEACAM6 *via* les pili de type 1 variant. Des vésicules de membranes externes (OMV), riches en protéine OmpA, sont relâchées et vont interagir avec la protéine Gp96 anormalement exprimée à la surface des cellules épithéliales intestinales chez les patients atteints de MC. Cette interaction permet de promouvoir l'invasion bactérienne *via* le relargage d'effecteurs. MI, membrane interne; ME, membrane externe; OMV, vésicules de membrane externe (modifiée d'après Rolhion *et al.*, 2011).

pathogènes (Rolhion *et al.*, 2005). Comme la plupart des bactéries pathogènes (Horstman and Kuehn, 2002; Wai *et al.*, 1995), la souche AIEC LF82 produit des quantités plus importantes d'OMV qu'une souche de *E. coli* K-12 non pathogène. De plus, la délétion du gène codant la protéine de membrane externe YfgL entraîne une incapacité de la bactérie AIEC LF82 à produire des OMV (Rolhion *et al.*, 2005). Cette lipoprotéine YfgL régule positivement des transglycosylases lytiques et serait donc impliquée dans le renouvellement du peptidoglycane de la paroi. Ainsi, en l'absence du produit du gène *yfgL*, l'activité des transglycosylases serait diminuée, entraînant une diminution de l'accumulation des produits de dégradation du peptidoglycane dans le périplasme, une diminution de la pression de turgescence exercée sur la membrane externe par ces produits de dégradation, et donc une diminution de la libération d'OMV. Cette délétion entraîne aussi une perte du pouvoir d'invasion du mutant. De manière intéressante, le pouvoir d'invasion d'un tel mutant est restauré lorsque les cellules hôtes sont prétraitées par des OMV de la souche sauvage. Cette interaction des OMVs avec la cellule hôte se fait par la reconnaissance entre la protéine bactérienne de membrane externe OmpA présente sur les OMV et le récepteur Gp96 anormalement surexprimé au niveau de la muqueuse iléale de patients MC (**Figure 40**) (Rolhion *et al.*, 2010). Ainsi, les OMV de la souche AIEC LF82 représenteraient un système de transport permettant de délivrer à la cellule hôte des effecteurs bactériens impliqués dans les réarrangements du cytosquelette cellulaire et favorisant l'internalisation des bactéries (Rolhion *et al.*, 2005). On peut également spéculer que ces OMV pourraient participer à la survie des bactéries AIEC dans des compartiments endocytaires en délivrant des protéines bactériennes interférant avec la signalisation de la cellule hôte, mais si de tels effecteurs existent, ils restent à être caractérisés.

#### III-3-4-7-4 Système d'osmorégulation EnvZ/OmpR et activation de la voie $\sigma^E$

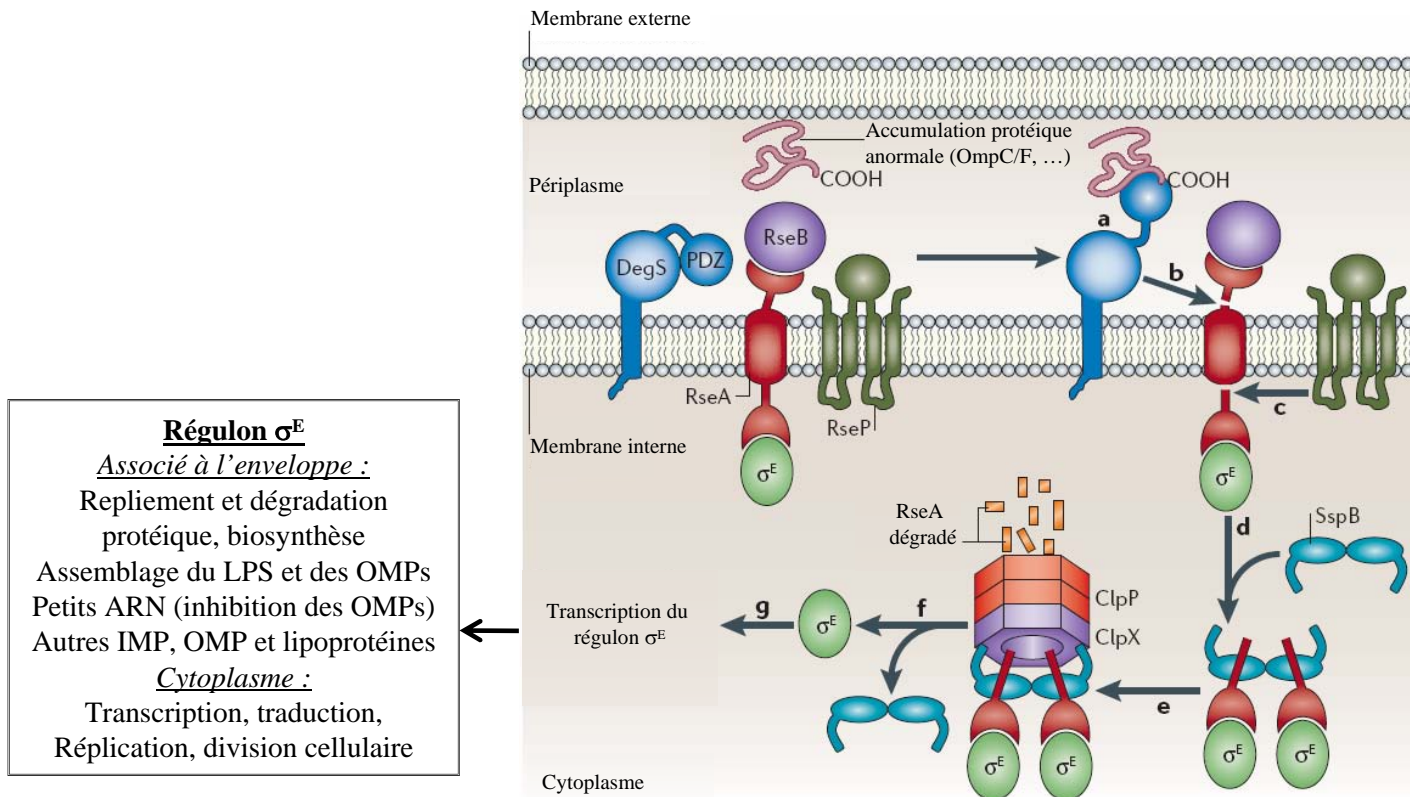
Les systèmes à deux composants sont des mécanismes de régulation transcriptionnelle permettant une adaptation rapide de la bactérie à son environnement. Ils sont communément retrouvés chez les procaryotes, mais quelques systèmes existent également chez des eucaryotes, tels que les levures et les plantes. Plus de 250 systèmes différents ont pu être identifiés dans le monde bactérien, dont une trentaine chez *E. coli* (Mizuno, 1997). Les systèmes de régulation à deux composants répondent à un stimulus spécifique et font intervenir deux protéines : un senseur enchâssé dans la membrane interne et un régulateur de



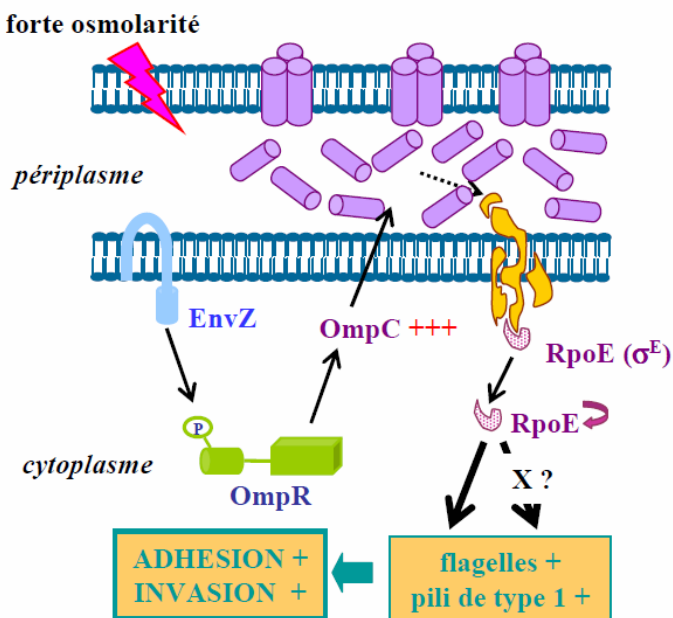
**Figure 41 : Schéma général du fonctionnement des systèmes de régulation à deux composants.** La détection d'un signal au niveau du domaine extracellulaire active le domaine histidine kinase du senseur, induisant la phosphorylation d'un résidu histidine. Le groupement phosphate est ensuite transféré sur un résidu aspartate du domaine d'activation du régulateur transcriptionnel, conduisant à l'activation du domaine de liaison à l'ADN. Le régulateur transcriptionnel activé peut ensuite se fixer sur des régions promotrices spécifiques pour activer ou inhiber la transcription de gènes cibles (modifiée d'après Rodrigue *et al.*, 2000).

transcription à localisation cytosolique (**Figure 41**) (Rodrigue *et al.*, 2000). L'activation de ces systèmes repose sur des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation. Le domaine N-terminal du senseur forme une boucle extracellulaire à localisation périplasmique et constitue le domaine de reconnaissance d'un signal particulier. La reconnaissance du signal par la protéine senseur induit en général l'autophosphorylation d'un résidu histidine localisé dans le domaine histidine kinase intracytoplasmique en C-terminal de la protéine senseur. La molécule donneuse du groupement phosphate lors de cette autophosphorylation est l'ATP. Grâce à l'activité phosphotransférase de la protéine senseur, le groupement phosphate est ensuite transféré sur un résidu aspartate localisé au niveau du domaine d'activation du régulateur transcriptionnel correspondant. Le régulateur transcriptionnel ainsi activé peut se fixer, via son domaine de liaison à l'ADN, sur des régions promotrices spécifiques pour activer ou réprimer la transcription de gènes cibles. Afin de limiter l'activation ou la répression de la transcription des gènes concernés, le régulateur transcriptionnel phosphorylé est rapidement inactivé grâce à une activité phosphatase qui, dans la majorité des systèmes à deux composants, se trouve au niveau de la protéine senseur (Mizuno, 1997).

Selon les conditions environnementales, la pression osmotique cytoplasmique des bactéries est variable. Afin de résister à une entrée d'eau, la bactérie doit mettre en place des mécanismes de transport pour maintenir la différence d'osmolarité entre le cytoplasme bactérien et le milieu extérieur. Par exemple, les entérobactéries doivent s'adapter aux changements rapides d'osmolarité rencontrés le long du tractus intestinal, et pour cela elles possèdent le système à deux composants EnvZ/OmpR qui régule la transcription notamment des gènes codant les porines OmpC et OmpF permettant de modifier la perméabilité membranaire. OmpC et OmpF sont présentes sous forme de trimères au sein de la membrane externe et sont fortement associées à la couche de peptidoglycane par des liaisons non covalentes (Basle *et al.*, 2006; Cowan *et al.*, 1992). L'expression des gènes codant les porines OmpC et OmpF est régulée différemment en réponse à plusieurs facteurs environnementaux. Ainsi le rapport OmpC/OmpF varie en fonction de l'osmolarité du milieu, mais aussi en fonction du pH et de la disponibilité en nutriments (Heyde and Portalier, 1987; Liu and Ferenci, 2001; Pratt *et al.*, 1996). Lorsque les conditions environnementales, telles que l'osmolarité, favorisent une forte expression des OMP, leur accumulation périplasmique et/ou leur mauvais repliement active la voie  $\sigma^E$ . La voie  $\sigma^E$ -dépendante fait appel à la sous-unité de l'ARN polymérase  $\sigma^E$ , aux protéines RseA et RseB, ainsi qu'à des protéases périplasmiques ou membranaires telles que DegS et RseP (Hayden and Ades, 2008; Young and Hartl, 2003). La protéine RseA comprend un domaine C-terminal cytoplasmique interagissant avec le



**Figure 42 : Activation de la voie de signalisation  $\sigma^E$ .** Suite à une accumulation anormale de protéines dans le périplasme, les protéases DegS et RseP, toutes deux ancrées à la membrane interne, permettent de libérer le facteur  $\sigma^E$  dans le cytoplasme. Après action de l'adaptateur SspB et de la protéase cytoplasmique ClpXP, le facteur  $\sigma^E$  libre joue alors son rôle d'activateur transcriptionnel sur le régulon  $\sigma^E$ . LPS, lipopolysaccharide; OMP, outer membrane protein; IMP, Inner membrane protein, (modifiée d'après Hayden *et al.*, 2008).



**Figure 43 : Modèle d'implication de la voie de signalisation impliquant le facteur  $\sigma^E$  dans la virulence de la souche AIEC LF82.** L'osmolarité du tractus intestinal active la voie du système à deux composants EnvZ/OmpR, ce qui se traduit par une augmentation de l'expression de OmpC. L'accumulation périplasmique de cette protéine libère le facteur de transcription alternatif  $\sigma^E$  qui est séquestré au niveau de la face interne de la membrane interne. Ce dernier va activer la transcription des gènes codant les pili, des flagelles, ainsi que d'autres facteurs de virulence (modifiée d'après Rolhion *et al.*, 2007).

facteur  $\sigma^E$ , permettant ainsi sa séquestration à proximité de la membrane interne et empêchant sa fonctionnalité (**Figure 42**). En cas de stress, le mauvais repliement de certaines protéines permet l'exposition d'un motif C-terminal de type YQF, normalement masqué au sein de ces protéines, qui active DegS en interagissant avec son domaine PDZ. La protéase DegS clive le domaine périplasmique de RseA. Ce clivage est favorisé par RseP qui dégrade à son tour la région membranaire de RseA. Le facteur  $\sigma^E$  est alors libéré et fonctionnel et il peut moduler l'expression de l'ensemble des gènes du régulon  $\sigma^E$  (Hayden and Ades, 2008; Young and Hartl, 2003).

Depuis la première mise en évidence du rôle du système à deux composants EnvZ/OmpR dans la régulation de la virulence de *Shigella flexneri* (Bernardini *et al.*, 1990), de nombreuses études ont montré l'importance de ces systèmes dans la virulence d'autres espèces bactériennes. Chez la souche AIEC de référence LF82, la forte osmolarité de la lumière intestinale est perçue par le système à deux composants EnvZ/OmpR, ce qui provoque une augmentation de synthèse de la porine OmpC (Rolhion *et al.*, 2007). La surexpression d'OmpC engendre une accumulation anormale de protéines dans le périplasme bactérien, entraînant alors l'activation de la voie de signalisation  $\sigma^E$  qui active l'expression des gènes codant les pili de type 1, les flagelles, mais aussi des facteurs de virulence non identifiés et impliqués dans l'interaction bactérie/cellule hôte (**Figure 43**) (Rolhion *et al.*, 2007).





*TRAVAUX*  
*PERSONNELS*





## Présentation des résultats

L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire avait pour objectif d'identifier et de caractériser des déterminants génétiques impliqués dans le pouvoir pathogène des souches AIEC isolées de lésions iléales chroniques de patients atteints de MC.

➤ Une première étude présente le rôle de la voie de signalisation RpoE dans la capacité des souches AIEC à former des biofilms bactériens. Elle démontre que cette voie de signalisation est impliquée, via l'activation de l'expression de facteurs bactériens, dans la formation de biofilms *in vitro* mais également *in vivo*, ce qui permettrait aux bactéries de coloniser efficacement et durablement la muqueuse intestinale.

➤ Une seconde étude présente le pouvoir d'interaction des souches AIEC avec les plaques de Peyer. Ces données montrent l'implication des *long polar fimbriae* dans le ciblage des plaques de Peyer par les souches AIEC, et ceci via un ciblage spécifique des cellules M.



## **I- Implication de la voie de signalisation $\sigma^E$ dans la capacité des souches AIEC à former des biofilms**

### **Publication n°1**

RpoE pathway is involved in biofilm formation by Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*

**Chassaing B.**, Bonnet R., Darfeuille-Michaud A.

En préparation pour *Environmental Microbiology*



## Introduction de la publication n°1

Les souches de *E. coli* adhérentes et invasives (AIEC), anormalement présentes au niveau des lésions iléales des patients atteints de maladie de Crohn, expriment des pili de type 1 variants impliqués dans le processus d'adhésion, et produisent des vésicules de membranes externes impliquées dans le processus d'invasion. Il a également pu être mis en évidence l'implication des facteurs bactériens HtrA et DsbA dans le pouvoir de survie et de multiplication de la souche AIEC de référence LF82 en macrophages.

L'analyse de la souche AIEC de référence LF82 a permis de montrer que la forte osmolarité de la lumière intestinale conduit à une surexpression d'OmpC (*Outer membrane protein C*) et à une accumulation anormale de protéines dans le périplasme bactérien, entraînant alors l'activation de la voie de signalisation  $\sigma^E$ . Il a pu être montré que cette voie de signalisation dépendante du facteur  $\sigma^E$  active l'expression des gènes codant les pili de type 1, les flagelles, mais aussi des facteurs de virulence non identifiés et impliqués dans l'interaction bactérie/cellule (Rolhion *et al.*, 2007).

De manière intéressante, chez une souche MG1655, la régulation passant par le facteur  $\sigma^E$  conduit à une diminution de l'expression des flagelles et des pili de type 1. Ainsi, le milieu intestinal pourrait constituer un signal clé dans le déclenchement de l'expression de gènes de virulence chez les souches AIEC associées à la MC. La différence de régulation de ces gènes chez les *E. coli* non-pathogènes et les AIEC pourrait représenter pour ces dernières un avantage adaptatif favorisant la colonisation de la muqueuse intestinale (Rolhion *et al.*, 2007).

Le but de cette première étude a été d'identifier l'ensemble du régulon dépendant du facteur  $\sigma^E$  chez les souches AIEC de référence LF82 et K-12 de référence MG1655, et de caractériser l'implication éventuelle de ces facteurs dans le pouvoir d'interaction des souches AIEC avec les cellules épithéliales intestinales. Notre hypothèse était qu'un ou plusieurs facteurs appartenant au régulon  $\sigma^E$  chez la souche AIEC de référence LF82 pourraient expliquer sa capacité d'interaction avec les cellules épithéliales de l'hôte.





1  **$\sigma^E$  pathway is involved in biofilm formation by Crohn's disease-associated**  
2 **adherent-invasive *Escherichia coli***

3  
4 Benoit Chassaing<sup>1,2</sup>, Richard Bonnet<sup>1,3</sup> and Arlette Darfeuille-Michaud<sup>1,2\*</sup>

5  
6 <sup>1</sup> Clermont Université, Université Auvergne, JE2526, USC INRA 2018, Clermont-Ferrand F-  
7 63000, France ;

8 <sup>2</sup> Institut Universitaire de Technologie, Génie Biologique, Aubière F-63172, France ;

9 <sup>3</sup> CHU Clermont-Ferrand, Laboratoire de bactériologie, Clermont-Ferrand, F-63003,  
10 France.

11  
12 **Short title:**  $\sigma^E$ -pathway mediated biofilm formation in AIEC.

13  
14 **Keywords:** Crohn's disease, adherent-invasive *E. coli*, biofilm,  $\sigma^E$ .

15  
16 **Disclosures:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

17  
18 **Abbreviations used in this paper:** CD, Crohn's disease; AIEC, adherent-invasive  
19 *Escherichia coli*.

20  
21 **\*Corresponding author:** Mailing address: Pathogénie Bactérienne Intestinale, CBRV, 28  
22 place Henri Dunant, 63001 Clermont-Ferrand, France. Phone: 33 4 73 17 79 97. Fax: 33 4 73  
23 17 83 71. E-mail: arlette.darfeuille-michaud@u-clermont1.fr

24  
25 **Acknowledgments:** this study was supported by the Ministère de la Recherche et de la  
26 Technologie (JE2526), INRA (USC-2018) and by grants from the Association F. Aupetit  
27 (AFA), and the European Commission through FP7 IBDase project. We thank the ICCF  
28 platform for confocal microscopy.



24           **Summary**

25           Ileal lesions of patients with Crohn's disease (CD) are colonized by adherent-invasive  
26 *Escherichia coli* (AIEC), able to adhere to and to invade intestinal epithelial cells (IEC), to  
27 replicate within macrophages and to form biofilm. Previous analyses indicated putative  
28 involvement of  $\sigma^E$  pathway in AIEC interaction with IEC. The aim of this study was to  
29 characterize  $\sigma^E$ -regulated genes involved in AIEC interaction with IEC. Inhibition of  $\sigma^E$   
30 pathway in AIEC LF82 led to impaired ability to colonize intestinal mucosa and to form  
31 biofilm. Comparative *in silico* analysis of  $\sigma^E$  regulon in strain LF82 and *E. coli* K-12 strain  
32 MG1655 indicated that 12 genes were putatively controlled by  $\sigma^E$  only in strain LF82. Among  
33 them, mRNA quantification after  $\sigma^E$  inhibition revealed that only ORF1 specific of LF82,  
34 *waaWVL* operon mostly present in AIEC strains and *ychH* gene were under  $\sigma^E$  control.  
35 Phenotype analysis of LF82 construct with impaired *waaWVL* expression indicated that this  
36 operon involved in LPS formation played an essential role in biofilm production and intestinal  
37 mucosa colonization. This indicated that targeting  $\sigma^E$  transcriptional factor or *waaWVL*  
38 operon could be very potent therapeutic strategies to interfere with the ability of AIEC to form  
39 biofilm and to colonize gut mucosa.

40



## 45 Introduction

46 Crohn's disease (CD) is an inflammatory bowel disease occurring in individuals with a  
47 genetic predisposition in whom an environmental or infectious trigger causes an abnormal  
48 immune response (Kaser *et al.*, 2010; Strober *et al.*, 2007; Xavier and Podolsky, 2007).  
49 Several lines of evidence suggest that bacteria play a role in the onset and perpetuation of  
50 inflammatory bowel disease (IBD) (Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2011). *Escherichia*  
51 *coli* has been assigned a putative role in CD. These bacteria are abnormally predominant in  
52 early and chronic ileal lesions of CD, and most *E. coli* strains isolated from the ileal mucosa  
53 of CD patients adhere to intestinal epithelial cells (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Martin *et*  
54 *al.*, 2004; Swidsinski *et al.*, 2002). In addition to their ability to adhere, *E. coli* cells are able  
55 to invade intestinal epithelial cells, and belong to the pathogenic group of adherent-invasive  
56 *E. coli* (AIEC) (Boudeau *et al.*, 1999). Many independent studies have reported the abnormal  
57 presence of AIEC bacteria associated with the ileal mucosa of CD patients (Baumgart *et al.*,  
58 2007; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Eaves-Pyles *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2004;  
59 Martinez-Medina *et al.*, 2009a; Sasaki *et al.*, 2007) owing to increased ileal expression of  
60 CEACAM6 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6), which acts as a  
61 receptor for AIEC binding to the intestinal mucosa (Barnich *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*,  
62 2009). The adhesion and invasion process of reference AIEC strain LF82 involves, in addition  
63 to type 1 pili, flagella, outer membrane proteins and outer membrane vesicles (Barnich *et al.*,  
64 2003; Boudeau *et al.*, 2001; Rolhion *et al.*, 2005; Rolhion *et al.*, 2007; Rolhion *et al.*, 2010).  
65 The LF82 invasion process occurs via the interaction between the endoplasmic reticulum  
66 (ER)-localized stress response chaperone Gp96 and the outer membrane protein OmpA  
67 expressed at the surface of outer membrane vesicles (OMV), allowing OMVs to fuse with  
68 intestinal epithelial cells and to deliver vesicle components and virulence factors to or into  
69 host cells (Rolhion *et al.*, 2010).

70  
71 Previous studies reported that Sigma E ( $\sigma^E$ ) pathway plays a crucial role in AIEC  
72 strain LF82, but not in non pathogenic *E. coli* K-12 MG1655, by regulating the expression of  
73 type 1 pili and flagella.  $\sigma^E$  factor, also called RpoE, is activated by stresses that interfere with  
74 the folding of outer membrane proteins (OMPs) such as heat shock, overexpression of OMP  
75 genes, and mutations in genes encoding chaperones required for OMP folding (Mecsas *et al.*,  
76 1995; Missiakas *et al.*, 1996; Rouviere *et al.*, 1995). As expected from its role in the stress  
77 response, the  $\sigma^E$  regulon includes genes encoding periplasmic foldases, proteases, and



78 chaperones that aid in OMP folding. In addition,  $\sigma^E$  transcribes an array of biosynthetic  
79 enzymes that are involved in phospholipid, fatty acid, LPS, and membrane-derived  
80 oligosaccharide synthesis and transport, and a number of other cell envelope proteins  
81 including lipoproteins, inner membrane proteins, and envelope proteins of unknown function  
82 (Dartigalongue *et al.*, 2001; Rezuchova *et al.*, 2003; Rhodius *et al.*, 2006). In AIEC strains, a  
83 model proposed by Rolhion and collaborators indicated that, at high osmolarity similar to that  
84 of the gastrointestinal tract, increased expression of OmpC in AIEC LF82 bacteria led to the  
85 activation of the  $\sigma^E$  regulatory pathway (Rolhion *et al.*, 2007). The authors reported that  $\sigma^E$   
86 pathway modulates flagella and/or type 1 pili encoding gene expression, but also the  
87 expression of genes encoding other yet unidentified virulence factors also involved in AIEC  
88 interactions with host cells.

89

90 The aim of the present study was to characterize AIEC virulence factor encoding  
91 genes whose transcription is regulated by  $\sigma^E$ . We report here the involvement of the  $\sigma^E$ -  
92 mediated pathway in the ability of AIEC strains to form biofilm and to colonize intestinal  
93 mucosa. Furthermore, with the recent access to the AIEC reference strain LF82 genome  
94 sequence (Miquel *et al.*, 2010a), analysis of its specific  $\sigma^E$  regulon revealed the presence of a  
95 *waaWVL* operon and experimental data demonstrated the involvement of *waaWVL* in the  
96 ability of AIEC strain LF82 to form biofilm.





## 97 Results

### 98 $\sigma^E$ pathway activation during adhesion process of AIEC strain LF82

99  $\sigma^E$  pathway was previously reported to be involved in the pathogenesis of AIEC strain  
100 LF82 compared to *E. coli* K-12 strain MG1655 by inducing expression of flagella, type 1 pili,  
101 and of still uncharacterized factors involved in the interaction of AIEC bacteria with host cells  
102 (Rolhion *et al.*, 2007). Our aim in the present study was to search in strain LF82 for these  
103 unknown factors whose expression is dependent on the  $\sigma^E$ -mediated pathway.  $\sigma^E$  pathway  
104 activation was analyzed by quantification of *rpoE* mRNA, since it is well established that  $\sigma^E$   
105 upregulates its own transcription (Rhodius *et al.*, 2006). After growth of AIEC strain LF82 or  
106 *E. coli* K-12 strain in an acid culture medium or in the presence of 2% bile salts, the *rpoE*  
107 mRNA levels were similar to those observed in bacteria grown in cell culture medium. In  
108 contrast, 2.7- and 2.3-fold increases in the *rpoE* mRNA levels were observed after growth of  
109 LF82 and MG1655 bacteria at high osmolarity, respectively (**Figure 1A and B**).  
110 Interestingly, when we analyzed  $\sigma^E$  pathway activation during the adhesion process, we also  
111 observed a high, 1.9-fold, increase in *rpoE* mRNA level in AIEC LF82 bacteria associated  
112 with intestinal epithelial cells (IEC). No increase was observed for MG1655 bacteria  
113 associated with IEC, even if similar adhesion levels to I-407 cells for AIEC strain LF82 and  
114 *E. coli* K-12 strain MG1655 were observed (**Figure 1C**). Altogether, these findings show that  
115 when high osmolarity activates  $\sigma^E$  pathway in both LF82 and MG1655 strains, the adhesion  
116 process activates  $\sigma^E$  pathway in AIEC strain LF82 but not in *E. coli* K-12 strain MG1655.

### 118 Identification of $\sigma^E$ regulon in AIEC strain LF82 and in *E. coli* K-12 strain MG1655

119 To identify specific genes whose transcription is putatively regulated by  $\sigma^E$  in strains  
120 LF82 and MG1655, HMMER software program (<http://hmmer.janelia.org/>, version 3.0) was  
121 used to define  $\sigma^E$ -binding consensus motifs using 28 DNA sequences previously reported to  
122 bind  $\sigma^E$  (Rhodius *et al.*, 2006) (*greA*, *yaeT*, *ygiM*, *rpoH*, *fkpA*, *rpoE*, *bacA*, *yggN*, *yfeY*, *clpX*,  
123 *yhjJ*, *yfeK*, *ybfG*, *ddg*, *yfgM*, *plsB*, *mdoG*, *yhbG*, *yfjO*, *rseA*, *yeaY*, *htrA*, *sixA*, *dsbC*, *sbmA*,  
124 *yieE*, *yraP*, *yfgC*, see Materials and Methods and **table 5**). The  $\sigma^E$ -binding consensus  
125 sequence obtained is presented in **figure 2A** and was used to perform genome-wide  
126 predictions of  $\sigma^E$ -binding consensus sites within the genomes of AIEC strain LF82 and K-12  
127 strain MG1655. This method allowed the identification of 53 and 52 genes, whose  
128 transcription is putatively regulated by  $\sigma^E$  in MG1655 strain (**Sup. Table 1**) and AIEC strain  
129 LF82 (**Sup. Table 2**), respectively. Comparison of the two gene sets with a transcription



130 under control of  $\sigma^E$  identified 40 genes in common in the two strains, 13 genes specific to K-  
131 12 strain MG1655 (**Table 1**) and 12 genes specific to AIEC strain LF82 (**Table 2**).

132

133 To confirm this *in silico* analysis, we decided to determine mRNA levels of the 12  
134 genes identified in a mutant of AIEC strain LF82 deleted for the  $\sigma^E$  encoding gene. We  
135 obtained no mutant, which suggest that such a mutation is probably lethal in this strain. To  
136 counteract this methodology problem, we generated strain LF82 transformed with plasmid  
137 pBAD24-*rseAB*, that allow the expression of the anti-sigma factors RseA and RseB, which  
138 prevent  $\sigma^E$  interaction with RNA polymerase (De Las Penas *et al.*, 1997; Missiakas *et al.*,  
139 1997). As control, quantification of *rpoE* mRNA levels showed that overexpression of RseAB  
140 led to a decreased expression in *rpoE* mRNA level in LF82-pBAD24-*rseAB* construct ( $0.63 \pm$   
141  $0.12$  fold decrease,  $P = 0.045$ ), thereby validating the model (**Figure 2B**). Analysis of the  
142 expression of the 12 genes identified *in silico* with transcription putatively under the control  
143 of  $\sigma^E$  in LF82 bacteria but not in MG1655 bacteria, ie *yjiW*, *lpfABCDE*, ORF1, ORF2, *yliF*,  
144 *ygcU*, *waaWVL*, ORF3, *gnd*, *uidC*, *yafT* and *ychH*, showed that only three of them presented  
145 decreased mRNA expression after inhibition of the  $\sigma^E$  pathway. This concerned open reading  
146 frame 1 specific to LF82, encoding a hypothetical protein with unknown function, gene *ychH*,  
147 encoding a hypothetical inner membrane protein, and gene *waaW* from the *waaWVL* operon,  
148 encoding three enzymes involved in LPS biosynthesis, with  $0.78 \pm 0.12$ ,  $0.61 \pm 0.04$  and  $0.59$   
149  $\pm 0.20$  relative levels compared to wild-type strain, respectively. However, only transcription  
150 of *waaW* was significantly decreased ( $P=0.039$ ).

151

152 *Involvement of the  $\sigma^E$  pathway in the ability of LF82 to interact with host cells and to*  
153 *form biofilm*

154 AIEC LF82 bacteria over-expressing the  $\sigma^E$  inhibitory complex RseAB had  
155 significantly decreased ability to adhere and to invade IEC (**Figure 3A and B**), with  $19.6 \% \pm$   
156  $5.9 \%$  and  $11.4 \% \pm 5.0 \%$  residual adhesion and invasion, respectively, compared to LF82  
157 wild type strain, taken as 100%. These findings demonstrate for the first time that the  $\sigma^E$   
158 pathway is directly involved in the adhesion and invasion process of AIEC strain LF82. Our  
159 investigations showed that the expression of type 1 pili and flagella in the AIEC LF82 strain  
160 harboring cloned *rseAB* was greatly decreased, which could explain its decreased adhesion  
161 and invasion abilities (**Data not shown**).

162



163 While we demonstrated that  $\sigma^E$ -mediated pathway was involved in the interaction of  
164 AIEC strain LF82 with host cells, we investigated the involvement of the three genes  
165 identified in strain LF82 as putatively under the control of  $\sigma^E$  (ORF1, *waaW* and *ychH*) by  
166 generating isogenic mutants. Of note, we failed to obtain any mutant deleted for *waaWVL*  
167 operon, which indicates that deletion of *waaWVL* could be lethal in AIEC strain LF82. To  
168 overcome this lethality, strain LF82- $\Delta$ *waaW* + pBAD24-*waaWVL* was constructed and the  
169 phenotype of the resulting construct was analyzed in the absence of arabinose. This model  
170 allowed only a very basal expression of *waaWVL* operon which counteracted lethality. Before  
171 studying the ability of  $\Delta$ ORF1,  $\Delta$ *waaW* and  $\Delta$ *ychH* mutants to adhere to and to invade IEC,  
172 we checked that their growth and viability in cell culture medium were not affected  
173 (**Supplemental figure 1**). None of the three isogenic mutants generated presented any  
174 decrease in their ability to interact with IEC (**Figure 3A and B**), unsurprisingly, since type 1  
175 pili and flagella expression was unchanged (**data not shown**).

176

177 Martinez-Medina *et al.* recently reported that biofilm formation capacity is a novel  
178 pathogenic feature of the AIEC pathovar. To elucidate whether  $\sigma^E$ -mediated pathway is  
179 involved in AIEC biofilm formation we compared biofilm production on the plastic surface of  
180 wild-type strain LF82 and of strain LF82 overexpressing RseA and B. Inhibition of the  $\sigma^E$   
181 pathway led to a significant decrease in the ability of strain LF82 to form biofilm, since LF82  
182 + pBAD24-*rseAB* strain had a mean specific biofilm formation (SBF) index of  $0.79 \pm 0.14$   
183 compared to  $3.23 \pm 0.14$  for wild type strain LF82 ( $P=0.00013$ ) (**Figure 4A**). Interestingly,  
184 inhibition of the  $\sigma^E$  pathway in *E. coli* K-12 strain MG1655 had no effect on its ability to  
185 form biofilm even if overexpression of the  $\sigma^E$  pathway inhibitory complex RseAB led to  
186 similar decreased expression of *rpoE* mRNA in both AIEC strain LF82 and *E. coli* K-12  
187 strain MG1655 (**Supplemental figure 2**). In addition, we observed that strain MG1655 had a  
188 similar SBF index ( $1.14 \pm 0.11$ ) to that of strain LF82 overexpressing RseAB ( $0.79 \pm 0.14$ ).  
189 These data suggest that the  $\sigma^E$  pathway is involved in the ability of AIEC strain LF82 to form  
190 biofilm, and that specific  $\sigma^E$ -regulated gene(s) in AIEC strain LF82 could be the cause of the  
191 greater ability of this strain to form biofilm compared to MG1655 strain.

192

193 The ability of strain LF82 and strain LF82 overexpressing RseAB to form biofilm  
194 were also analyzed using an original method that we developed with PFA-fixed intestinal  
195 epithelial cells on glass coverslips. Results presented in **figure 4B** show that strain LF82 was



196 able to form biofilm at the surface of fixed intestinal epithelial cells, as observed in z-sections.  
197 In contrast, with strain LF82 + pBAD24-*rseAB* and the K-12 strain MG1655, only a few  
198 diffusely adhering bacteria were observed at the surface of the intestinal epithelial cells.  
199 Finally, the phenotype of strain LF82 + pBAD24-*rseAB* was analyzed in another approach  
200 using intestinal ileal loop assay as an *in vivo* model to assess the interaction of bacteria with  
201 intestinal mucosa. The intestinal ileal loops were inoculated with a mixed inoculum  
202 comprising equivalent numbers of wild-type LF82 and LF82 + pBAD24-*rseAB* bacteria, and  
203 their presence was compared after 24h by competitive index (CI) analysis, which provided a  
204 sensitive measurement of the relative degree of attenuation (Beuzon and Holden, 2001). The  
205 LF82 strain overexpressing RseAB had a mean CI of  $0.27 \pm 0.033$ , indicating that its ability  
206 to interact with the surface of intestinal ileal biopsy was greatly impaired compared to that of  
207 wild-type strain ( $P < 0.001$ ) (**Figure 4C**).

208

209 *The  $\sigma^E$ -regulated waaWVL operon is involved in biofilm formation*

210 As described above, we identified ORF1, WaaW and YchH encoding genes as  
211 predicted to be regulated by  $\sigma^E$  in strain LF82. We therefore investigated their role in the  
212 ability of AIEC strain LF82 to produce biofilm. The analysis of the corresponding isogenic  
213 mutants revealed that mutants deleted for ORF1 and *ychH* were not modified in their ability  
214 to form biofilm. In contrast, mutant LF82- $\Delta$ *waaW* had greatly decreased biofilm formation  
215 (SBF =  $0.55 \pm 0.09$ ,  $P = 0.00016$ ) compared to that of wild type strain LF82 (SBF =  $3.62 \pm$   
216  $0.14$ ) (**Figure 5A**). Of note, the biofilm formation index of the LF82- $\Delta$ *waaW* mutant was  
217 similar to that of LF82 overexpressing RseAB complex (SBF =  $0.55 \pm 0.09$  and  $0.72 \pm 0.27$ ,  
218 respectively).

219

220 The biofilm formation ability of strain LF82 and mutant LF82- $\Delta$ *waaW* + pBAD24-  
221 *waaWVL* was also analyzed at the surface of PFA-fixed intestinal epithelial cells. Strain LF82  
222 formed biofilm at the surface of the intestinal epithelial cells, as observed in z-section, but not  
223 mutant LF82- $\Delta$ *waaW* + pBAD24-*waaWVL* (**Figure 5B**). Intestinal ileal loop assays with  
224 wild-type LF82 bacteria and LF82- $\Delta$ *waaW* showed that the LF82 mutant with inhibition of  
225 *waaWVL* expression had a mean CI of  $0.38 \pm 0.05$ , indicating that in the absence of WaaWVL  
226 expression the presence of bacteria at the surface of intestinal mucosa was greatly impaired  
227 compared to that of wild-type strain ( $P < 0.0001$ ) (**Figure 5C**). Interestingly, **figures 4C** and  
228 **5C** show that a similar phenotype was observed for the mutant LF82- $\Delta$ *waaW* and strain LF82





229 overexpressing RseAB, which suggests that *waaWVL* in AIEC strain LF82 could be the major  
230 factor involved in  $\sigma^E$ -mediated biofilm formation and increased interaction with intestinal  
231 mucosa.

232

233 *Involvement of waaWVL operon in biofilm formation abilities of various E. coli strains*  
234 *belonging to the B2 phylogroup*

235 BLAST analysis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) showed that *waaWVL* operon was also  
236 present in two other sequenced AIEC strains (NRG 857C (Nash *et al.*, 2010) and UM146  
237 (Krause *et al.*, 2010)), as well as in urinary pathogenic *E. coli* strains CFT073 (Welch *et al.*,  
238 2002), UTI89 (Chen *et al.*, 2006) and 536 (Hochhut *et al.*, 2006) responsible for urinary tract  
239 infection and in avian pathogenic strain APEC strain 01 (Johnson *et al.*, 2007) (**Supplemental**  
240 **figure 4**). Interestingly, all these strains including AIEC LF82 belong to phylogenetic group  
241 B2, and analysis of AIEC strain LF82 genome sequence showed that it is close to that of  
242 UPEC and APEC strains on the basis of flexible genome and single nucleotide  
243 polymorphisms in various virulence factors (Miquel *et al.*, 2010b).

244

245 Comparison of nucleotide sequences showed that *waaWVL* operons shared 99 to 100%  
246 homology between these strains (**Supplemental figure 4B**), suggesting that it could be  
247 involved in biofilm formation in UPEC and APEC strains. We therefore generated mutants  
248 deleted for *waaW* in UPEC strains CFT073, UTI89 and 536 and APEC strain 01, and  
249 observed that the ability of the four wild type strains to form biofilm was significantly lower  
250 than that of AIEC strain LF82 (SBF LF82 =  $3.62 \pm 0.14$ ; SBF CFT073 =  $0.80 \pm 0.14$ ; SBF  
251 UTI89 =  $0.96 \pm 0.10$ ; SBF 536 =  $1.67 \pm 0.10$ ; SBF APEC-01 =  $2.42 \pm 0.18$ ; **Figure 5C**).  
252 Unexpectedly, none of the UPEC or APEC strains were affected in their biofilm formation  
253 after *waaW* deletion, suggesting that the involvement of *waaWVL* operon in mediating  
254 biofilm formation could be specific to AIEC.



## Discussion

Clinical observations showed that bacterial biofilms were associated with the mucosa of IBD patients, since the mean density of the mucosal biofilm was 2-fold higher in IBD patients than in patients with IBS or controls, and that the bacteria were mostly adherent (Swidsinski *et al.*, 2005). Among bacteria highly adherent to the ileal mucosa of CD patients adherent-invasive *E. coli* has been observed (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004), in which we have identified type 1 pili and flagella as important virulence factors mediating the interaction of the bacteria with intestinal epithelial cells (Barnich *et al.*, 2003; Boudeau *et al.*, 2001). In AIEC strain LF82, a model elaborated by Rolhion *et al.* proposed that, at high osmolarity similar to that of the gastrointestinal tract, the activation of the  $\sigma^E$  regulatory pathway modulates the genes expression of flagella and/or type 1 pili encoding, and also the expression of genes encoding other yet unidentified virulence factors involved in AIEC interactions with host cells (Rolhion *et al.*, 2007). Such involvement of the  $\sigma^E$  pathway has been reported in various pathogens. For example, it is involved in the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, since after  $\sigma^E$  inactivation, *Salmonella* were no longer able to survive inside macrophages and were highly attenuated in their virulence in mice (Humphreys *et al.*, 1999). In *Vibrio cholerae*, a  $\Delta rpoE$  mutant was highly attenuated in its ability to colonize the intestine and in its lethal effect on mice (Kovacikova and Skorupski, 2002).

The role of  $\sigma^E$  pathway in the ability of *E. coli* to interact with intestinal epithelial cells was observed for AIEC strain LF82 but not for the non pathogenic *E. coli* K-12 MG1655. In the present study, comparison of  $\sigma^E$ -mediated activation in AIEC strain LF82 and in non pathogenic *E. coli* K-12 strain MG1655 showed that, when the bacteria interact with intestinal epithelial cells,  $\sigma^E$  mRNA level increased in AIEC strain LF82, but not in strain K-12. Since it is well established that  $\sigma^E$  upregulates its own transcription, (Rhodius *et al.*, 2006), this indicates that AIEC adhesion to host cells leads to activation of the  $\sigma^E$  pathway. This is the first report indicating such an activation of  $\sigma^E$  pathway in bacteria interacting with host cells and is in contrast with a previous report concerning *Neisseria gonorrhoeae* in which the analysis of global gene expression during the interaction of the bacteria with intestinal epithelial cells showed that there was no activation of the  $\sigma^E$  pathway during the adhesion process (Du *et al.*, 2005).



287 Analysis of the relationship between AIEC phenotype and activation of the  $\sigma^E$ -  
288 mediated pathway indicated that  $\sigma^E$  plays a crucial role in AIEC LF82 since inhibition of this  
289 pathway greatly decreased the adhesion and invasion process. This direct role of the  $\sigma^E$   
290 pathway in the adhesion and invasion phenotype of AIEC strains is probably linked to the  
291 highly decreased expression of flagella and type 1 pili observed after  $\sigma^E$ -pathway inhibition.  
292 In addition, when we analyzed another phenotypic characteristic of AIEC strains, i.e. the  
293 ability to form bacterial biofilm, as described by Martinez-Medina *et al* (Martinez-Medina *et*  
294 *al.*, 2009b), we observed that inhibition of the  $\sigma^E$  pathway led to greatly decreased ability of  
295 AIEC strain LF82 to form biofilm on plastic surfaces and on fixed intestinal epithelial cells.  
296 These findings suggest that any gene whose transcription is under the control of  $\sigma^E$  could be  
297 involved in biofilm formation by AIEC strain LF82 and that this factor or its  $\sigma^E$ -dependent  
298 expression is absent in K-12 strain MG1655. In addition, we developed an *in vivo* intestinal  
299 ileal loop assay model to performed competitive index analyze between wild-type strain LF82  
300 and LF82 overexpressing RseAB. A similar competitive index, previously used for the  
301 identification of virulence factors in *Salmonella* spp. strains (Beuzon and Holden, 2001) and  
302 *Listeria monocytogenes* (Auerbuch *et al.*, 2001), provided a sensitive measurement of the  
303 relative degree of attenuation of wild-type strains and corresponding mutants. Results  
304 revealed that, after inhibition of the  $\sigma^E$  pathway, the presence of AIEC LF82 bacteria at the  
305 surface of murine intestinal mucosa was highly impaired. Such a phenotype was not observed  
306 with K-12 strain MG1655.

307

308 The identification of gene(s) whose transcription could be under the control of  $\sigma^E$  and  
309 putatively involved in biofilm formation in AIEC strain LF82 was based on a previous study  
310 performed by Rhodius and collaborators (Rhodius *et al.*, 2006), aimed to identify the  $\sigma^E$   
311 régulon in *E. coli* K-12 strain MG1655 using a defined  $\sigma^E$  consensus fixation domain and *in*  
312 *silico* genome screening. In the present study, we specified more precisely a  $\sigma^E$  consensus  
313 fixation domain based on the analysis of 28 *E. coli* genes known to be  $\sigma^E$ -regulated. This  
314 screening method allowed the identification of 53 and 52 genes, whose transcription is  
315 putatively regulated by  $\sigma^E$  in MG1655 strain and in AIEC strain LF82, respectively.  
316 Comparison of the two gene sets with a transcription under control of  $\sigma^E$  identified 12 genes  
317 specific to AIEC strain LF82. Analysis of the LF82  $\sigma^E$  dependent regulon failed to identify  $\sigma^E$   
318 consensus fixation domain upstream of *fim* and *fli* operons, encoding type 1 pili and flagella,  
319 respectively. It also failed to identify intermediate factor involved in the transcriptional



320 activation of *fim* and *fli* operons. Based on this data, additional experiments are needed in the  
321 aim to identify molecular mechanisms that could explain the absence of type 1 pili and  
322 flagella expression when  $\sigma^E$  pathway is inactivated. Interestingly, a recent study showed that  
323 the  $\sigma^E$  pathway promotes flagella expression in *Salmonella enterica* serovar Typhi under  
324 hyperosmotic stress (Du *et al.*, 2011). However, the mechanism of the transcriptional  
325 regulation of flagella by the  $\sigma^E$  pathway has not yet been identified. Of note, among genes  
326 predicted to have a transcription under  $\sigma^E$  control, we identified the *lpf* operon, encoding long  
327 polar fimbriae, which were reported to allow AIEC bacteria, via the interaction with M cells,  
328 to interact with Peyer's patches (Chassaing *et al.*, 2011). However mRNA quantification  
329 when  $\sigma^E$  pathway was inhibited in AIEC strain LF82 provided no evidence of such a  
330 regulation.

331

332 Analysis of phenotypes associated with deletion of the 12 AIEC strain LF82 specific  
333  $\sigma^E$  regulon members showed that none were involved in the adhesion and invasion process,  
334 but that 1 of them, *waaWVL*, plays a crucial role in biofilm formation. Interestingly, the  
335 decrease in biofilm formation after *waaW* deletion was similar to that observed after  $\sigma^E$   
336 pathway inhibition. Of note, flagella and type 1 pili expression were unchanged in  $\Delta waaW$   
337 isogenic mutant, demonstrating that these two factors were not involved in the drastic  
338 decrease in biofilm formation observed.

339

340 BLAST analysis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and Interproscan analysis  
341 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) revealed that the three enzymes encoded by the  
342 *waaWVL* operon were WaaW, a LPS alpha1,2-galactosyl transferase, WaaV, a beta1,3-  
343 glucosyltransferase, and WaaL, a lipid A-core surface polymerligase with an O-antigen ligase  
344 related domain. These three enzymes are predicted to be involved in LPS biosynthesis, and  
345 more specifically in lipid A and O antigen biosynthesis. Similar enzymes were described to  
346 affect the structure, the composition, and the length of bacterial LPS (Kaniuk *et al.*, 2004;  
347 Leipold *et al.*, 2007). Interestingly, it is well established that modification of LPS composition  
348 and/or length can affect the virulence of pathogenic bacteria, as shown in a study of *Shigella*  
349 *flexneri* using an *in vivo* model (Sandlin *et al.*, 1996). Relevant to the study presented here,  
350 changes in LPS composition or length can also affect biofilm formation as reported for  
351 *Pseudomonas aeruginosa* (Ciornei *et al.*, 2010) and *Escherichia coli* (Beloin *et al.*, 2006).

352





353 BLAST analysis indicated that *waaWVL* operon is present in various *E. coli* strains  
354 belonging to B2 phylogroup, including CD-associated AIEC strains NRG857C and UM146,  
355 APEC strain 01 and UPEC strains 536, UTI89 and CFT073. Compared to the wild-type  
356 UPEC strain UTI89, a  $\Delta rpoE-rseAB$  mutant was less able to form biofilms (Kulesus *et al.*,  
357 2008). However, in this study, we failed to demonstrate involvement of WaaWVL factors in  
358 the ability of APEC and UPEC strains to form biofilm, since deletion of *waaWVL* operon in  
359 APEC and UPEC strains did not modify their production. There are two possible explanations  
360 of these findings. One is that the *waaWVL* operon could not be expressed in these strains;  
361 which would explain why they are less able to form biofilm than AIEC strain LF82. However,  
362 when additional biofilm experiments were conducted with over-expression of cloned  
363 *waaWVL* operon in these strains, we failed to identify any increased biofilm production.  
364 Another explanation is that modification of LPS by WaaWVL putative enzymes is dependent  
365 on LPS serogroup, since AIEC strain LF82 is of O83 serogroup and none of the APEC and  
366 UPEC strains tested belong to this O serogroup. In addition, WaaWVL expression in K-12  
367 strain MG1655 is not sufficient to increase biofilm formation to a similar level as that  
368 observed in AIEC strain LF82. Overall, these findings suggest that WaaWVL expression is  
369 necessary but not sufficient for the high biofilm formation ability of AIEC strain LF82.

370

371 In conclusion, our findings demonstrate a specific activation of the  $\sigma^E$ -mediated  
372 pathway during the adhesion process of AIEC strain LF82, that results in an increased ability  
373 of bacteria to adhere to and to invade intestinal epithelial cells and to form biofilm. The  
374 results bring into light an original *waaWVL* operon, whose transcription which is dependent  
375 on  $\sigma^E$  factor is activated when bacteria interact with intestinal epithelial cells, and possibly  
376 involved in AIEC strains colonization of the intestinal mucosa of CD patients.



377 **Experimental procedures**

378 *Reference bacterial strains, plasmids, and cell lines*

379 The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in **table 3**. Bacteria  
380 were grown routinely in LB broth overnight at 37°C and without shaking. Antibiotics were  
381 added to media at the following concentrations: ampicillin (50 mg.mL<sup>-1</sup>), kanamycin (50  
382 mg.mL<sup>-1</sup>) and chloramphenicol (25 mg.mL<sup>-1</sup>).

383

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

391

392 *Adhesion and invasion assay*

393 The bacterial adhesion assay was performed as described previously (Boudeau *et al.*,  
394 1999). Briefly, Intestine-407 cells were seeded in 24-well tissue culture plates with 4 x 10<sup>5</sup>  
395 cells per well. Monolayers were then infected at a multiplicity of infection of 10 bacteria per  
396 cell in 1 ml of the cell culture medium without antibiotics and with heat-inactivated fetal calf  
397 serum (FCS, PAA). After a 3 h incubation period at 37°C, monolayers were washed three  
398 times in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). The epithelial cells were then lysed with  
399 1% Triton X-100 (Euromedex) in deionized water. Samples were diluted and plated onto  
400 Muller-Hinton agar plates to determine the number of colony-forming units (cfu)  
401 corresponding to the total number of cell-associated bacteria (adherent and intracellular  
402 bacteria). To determine the number of intracellular bacteria, fresh cell culture medium  
403 containing 100 mg.ml<sup>-1</sup> gentamicin was added for 1 h to kill extracellular bacteria.  
404 Monolayers were then lysed with 1% Triton X-100, and bacteria were quantified as described  
405 above.

406

407 *Construction of isogenic mutants and transcomplementation assays*

408 Isogenic mutants were generated with a PCR product using the method described by  
409 Datsenko *et al.* (Datsenko and Wanner, 2000) and modified by Chaverroche *et al.* (Chaverroche  
410 *et al.*, 2000). Primers used are listed in **table 4**. For transcomplementation assays, a PCR



411 product containing the entire 1,614 bp *rseAB* operon, the entire 575 bp *rpoE* gene, or the  
412 entire 3,389 bp *waaWVL* operon were cloned into the pBAD24 vector (Guzman *et al.*, 1995)  
413 (**Table 3 and 4**).

414

415  *$\sigma^E$ -binding consensus elaboration, and determination of  $\sigma^E$ -regulated genes in AIEC*  
416 *reference strain LF82 and E. coli K-12 strain MG1655.*

417 The HMMER (<http://hmmer.janelia.org/>) software program (version 3.0) was used for  
418 the identification of  $\sigma^E$ -binding motifs within 28 sequences previously reported to bind  $\sigma^E$   
419 protein (Rhodius *et al.*, 2006) (**Table 5**). HMMER uses probabilistic models called profile  
420 hidden Markov models to identify likely motifs within the input set of sequences. It produces  
421 a consensus sequence and a position specific probability matrix, which has probabilities  
422 associated with each base at each position. The aligned  $\sigma^E$  promoter sequences were  
423 visualized using sequence logo ((Crooks *et al.*, 2004); <http://weblogo.berkeley.edu/>). We then  
424 applied the HMMER program, using the motif matrix previously determined, to search for the  
425 motif in the whole genome of *E. coli* K-12 strain MG1655 and AIEC reference strain LF82  
426 (Blattner *et al.*, 1997; Miquel *et al.*, 2010b). The algorithm in HMMER calculates position z-  
427 scores for the motif at each possible position within a sequence. Only the motif hits with a  
428 HMMER-score higher than 1 and located at less than 1100bp from the translation start point  
429 were considered to be putative  $\sigma^E$ -binding sites (Rhodius *et al.*, 2006).

430

431 *RNA manipulations, reverse transcription and RT-PCR*

432 Cultures were grown at 37°C in LB with or without NaCl, in Eagle medium  
433 supplemented with 10% (vol/vol) of heat inactivated fetal bovine serum at normal pH (pH =  
434 7.0 - 7.5), at pH = 6, or with 2% bile salts (Sodium choleate, Sigma Aldrich). At OD 0.2 at  
435 620 nm and when needed, L-arabinose was added to induce the overexpression of RseAB.  
436 Total RNAs were extracted from overnight-cultured bacteria and treated with DNase (Roche  
437 Diagnostics) to remove any contaminating genomic DNA. For RNA isolation from bacteria  
438 associated with epithelial Intestine-407 cells and from bacteria grown in MEM a protocol  
439 adapted from Lucchini *et al.* ((Lucchini *et al.*, 2005)) was used.

440

441 The RNAs were reverse transcribed and amplified using specific primers to *rpoE*,  
442 *yjiW*, *lpfA*, ORF1, ORF2, *yliF*, *ygcU*, *waaWVL*, ORF3, *gnd*, *uidC*, *yafT*, *ychH* mRNAs or 16S  
443 rRNA (**Table 4**). Amplification of a single expected PCR product was confirmed by



444 electrophoresis on a 2% agarose gel. RT-PCR was performed using an Eppendorf Realplex  
445 and the RNA levels were quantified using RNA master SYBR Green I (Roche Diagnostic)  
446 with 0.25 mg of total RNA.

447

#### 448 *Biofilm formation assays*

449 Biofilm formation assays were performed using a previously described method  
450 (Martinez-Medina *et al.*, 2009b). Strains were grown overnight in Luria-Bertani broth with 5  
451 g.L<sup>-1</sup> of glucose (Euromedex) at 35.5°C, after which 1/100 dilutions were made in M63  
452 minimal medium (US Biological) supplemented with 8 g.L<sup>-1</sup> (0.8%) glucose. 130- $\mu$ l aliquots  
453 were then placed in wells of non-cell-treated polystyrene microtiter plates and incubated  
454 overnight at 30°C without shaking. Afterwards, growth optical densities (OD) were read at  
455 630 nm. The wells were washed once, and adhered bacteria were stained with 1% crystal  
456 violet solubilised in ethanol, and ODs read at 570 nm. Biofilm measurements were calculated  
457 using the formula  $SBF = (AB - CW) / G$ , in which SBF is the specific biofilm formation, AB is  
458 the OD<sub>570nm</sub> of the attached and stained bacteria, CW is the OD<sub>570nm</sub> of the stained control  
459 wells containing only bacteria-free medium (to eliminate unspecific or abiotic OD values),  
460 and G is the OD<sub>630nm</sub> of cell growth in broth (Naves *et al.*, 2008; Niu and Gilbert, 2004).  
461 Assays were performed in triplicate.

462

463 Biofilm formation assays were also performed using PFA-fixed intestinal epithelial  
464 cells I-407 monolayers. Briefly, confluent I-407 monolayers were fixed for 15 min in 4%  
465 PFA, and, after washing, bacterial strains expressing GFP (Valdivia *et al.*, 1996) were applied  
466 in M63 minimal medium as previously described and incubated overnight at 30°C without  
467 shaking. For visualization, infected epithelial monolayers were fixed for 15 min in 4% PFA,  
468 phalloidin-TRITC were used to visualize actin and Hoechst strains were used to visualize  
469 nuclei. The slides were examined with a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope.

470

#### 471 *Mouse ileal loop experiments*

472 Six-week-old FVB wild-type male mice were starved for 24 before surgery, with  
473 water available ad libitum. They were anesthetized, and their intestines exteriorized through a  
474 midline incision (Hitotsubashi *et al.*, 1992). Two or three intestinal segments (about 1 cm)  
475 without PP were ligated and inoculated by mixed inoculums comprising equivalent numbers  
476 ( $5 \cdot 10^7$  CFU) of two bacterial strains (LF82 / LF82, LF82 / LF82 + pBAD24-*rseAB*, and LF82  
477 / LF82- $\Delta$ *waaWVL* + pBAD24-*waaWVL*), and their presence was compared after 24h by





478 competitive index (CI) analysis, which provides a sensitive measurement of the relative  
479 degree of attenuation (Beuzon and Holden, 2001).

480

481 *Statistical analysis*

482 Numerical values were expressed as means with SEM. Statistical comparisons were  
483 performed using 2-tailed student *t* test, unless the variables required a 2-tailed Fisher exact  
484 test. A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01,  
485 \*\*\**P* < 0.001.

486



487           **References**

- 488   Auerbuch, V., Lenz, L.L., and Portnoy, D.A. (2001) Development of a competitive index  
489            assay to evaluate the virulence of *Listeria monocytogenes actA* mutants during  
490            primary and secondary infection of mice. *Infect Immun* **69**: 5953-5957.
- 491   Barnich, N., Boudeau, J., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2003) Regulatory and  
492            functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of  
493            AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol Microbiol* **48**:  
494            781-794.
- 495   Barnich, N., Carvalho, F.A., Glasser, A.L., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., Peeters, H.,  
496            Bommelaer, G., Desreumaux, P., Colombel, J.F., and Darfeuille-Michaud, A. (2007)  
497            CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa  
498            colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* **117**: 1566-1574.
- 499   Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., Orsi, R.H.,  
500            Wiedmann, M., McDonough, P., Kim, S.G., Berg, D., Schukken, Y., Scherl, E., and  
501            Simpson, K.W. (2007) Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a  
502            selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion  
503            of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *Isme J* **1**: 403-418.
- 504   Beloin, C., Michaelis, K., Lindner, K., Landini, P., Hacker, J., Ghigo, J.M., and Dobrindt, U.  
505            (2006) The transcriptional antiterminator RfaH represses biofilm formation in  
506            *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 1316-1331.
- 507   Beuzon, C.R., and Holden, D.W. (2001) Use of mixed infections with *Salmonella* strains to  
508            study virulence genes and their interactions in vivo. *Microbes Infect* **3**: 1345-1352.
- 509   Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-  
510            Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W.,  
511            Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., and Shao, Y. (1997) The  
512            complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1462.
- 513   Boudeau, J., Glasser, A.L., Masseret, E., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A. (1999) Invasive  
514            ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with  
515            Crohn's disease. *Infect Immun* **67**: 4499-4509.
- 516   Boudeau, J., Barnich, N., and Darfeuille-Michaud, A. (2001) Type 1 pili-mediated adherence  
517            of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial  
518            invasion of intestinal epithelial cells. *Mol Microbiol* **39**: 1272-1284.
- 519   Carvalho, F.A., Barnich, N., Sivignon, A., Darcha, C., Chan, C.H., Stanners, C.P., and  
520            Darfeuille-Michaud, A. (2009) Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli*



521 colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human  
522 CEACAM. *J Exp Med* **206**: 2179-2189.

523 Chassaing, B., and Darfeuille-Michaud, A. (2011) The commensal microbiota and  
524 enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases.  
525 *Gastroenterology* **140**: 1720-1728 e1723.

526 Chassaing, B., Rolhion, N., Vallee, A., Salim, S.Y., Prorok-Hamon, M., Neut, C., Campbell,  
527 B.J., Soderholm, J.D., Hugot, J.P., Colombel, J.F., and Darfeuille-Michaud, A. (2011)  
528 Crohn disease-associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human  
529 Peyer's patches via long polar fimbriae. *J Clin Invest* **121**: 966-975.

530 Chaveroche, M.K., Ghigo, J.M., and d'Enfert, C. (2000) A rapid method for efficient gene  
531 replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* **28**:  
532 E97.

533 Chen, S.L., Hung, C.S., Xu, J., Reigstad, C.S., Magrini, V., Sabo, A., Blasiar, D., Bieri, T.,  
534 Meyer, R.R., Ozersky, P., Armstrong, J.R., Fulton, R.S., Latreille, J.P., Spieth, J.,  
535 Hooton, T.M., Mardis, E.R., Hultgren, S.J., and Gordon, J.I. (2006) Identification of  
536 genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a  
537 comparative genomics approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5977-5982.

538 Ciornei, C.D., Novikov, A., Beloin, C., Fitting, C., Caroff, M., Ghigo, J.M., Cavaillon, J.M.,  
539 and Adib-Conquy, M. (2010) Biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* bacteria  
540 undergo lipopolysaccharide structural modifications and induce enhanced  
541 inflammatory cytokine response in human monocytes. *Innate Immun* **16**: 288-301.

542 Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., and Brenner, S.E. (2004) WebLogo: a sequence logo  
543 generator. *Genome Res* **14**: 1188-1190.

544 Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P.,  
545 Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., and Colombel, J.F. (1998) Presence of adherent  
546 *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease.  
547 *Gastroenterology* **115**: 1405-1413.

548 Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.L., Barnich, N., Bringer,  
549 M.A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J.F. (2004) High prevalence of  
550 adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease.  
551 *Gastroenterology* **127**: 412-421.

552 Dartigalongue, C., Missiakas, D., and Raina, S. (2001) Characterization of the *Escherichia*  
553 *coli* sigma E regulon. *J Biol Chem* **276**: 20866-20875.



554 Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in  
555 *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645.

556 De Las Penas, A., Connolly, L., and Gross, C.A. (1997) The sigmaE-mediated response to  
557 extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two  
558 negative regulators of sigmaE. *Mol Microbiol* **24**: 373-385.

559 Du, H., Sheng, X., Zhang, H., Zou, X., Ni, B., Xu, S., Zhu, X., Xu, H., and Huang, X. (2011)  
560 RpoE may promote flagellar gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhi  
561 under hyperosmotic stress. *Curr Microbiol* **62**: 492-500.

562 Du, Y., Lenz, J., and Arvidson, C.G. (2005) Global gene expression and the role of sigma  
563 factors in *Neisseria gonorrhoeae* in interactions with epithelial cells. *Infect Immun* **73**:  
564 4834-4845.

565 Eaves-Pyles, T., Allen, C.A., Taormina, J., Swidsinski, A., Tutt, C.B., Eric Jezek, G., Islas-  
566 Islas, M., and Torres, A.G. (2007) *Escherichia coli* isolated from a Crohn's disease  
567 patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal  
568 epithelial cells. *Int J Med Microbiol*.

569 Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation,  
570 and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J*  
571 *Bacteriol* **177**: 4121-4130.

572 Hitotsubashi, S., Fujii, Y., Yamanaka, H., and Okamoto, K. (1992) Some properties of  
573 purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Infect Immun* **60**: 4468-4474.

574 Hochhut, B., Wilde, C., Balling, G., Middendorf, B., Dobrindt, U., Brzuszkiewicz, E.,  
575 Gottschalk, G., Carniel, E., and Hacker, J. (2006) Role of pathogenicity island-  
576 associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain  
577 536. *Mol Microbiol* **61**: 584-595.

578 Humphreys, S., Stevenson, A., Bacon, A., Weinhardt, A.B., and Roberts, M. (1999) The  
579 alternative sigma factor, sigmaE, is critically important for the virulence of *Salmonella*  
580 Typhimurium. *Infect Immun* **67**: 1560-1568.

581 Johnson, T.J., Kariyawasam, S., Wannemuehler, Y., Mangiamele, P., Johnson, S.J., Doetkott,  
582 C., Skyberg, J.A., Lynne, A.M., Johnson, J.R., and Nolan, L.K. (2007) The genome  
583 sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong  
584 similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J Bacteriol* **189**:  
585 3228-3236.

586 Kaniuk, N.A., Vinogradov, E., Li, J., Monteiro, M.A., and Whitfield, C. (2004) Chromosomal  
587 and plasmid-encoded enzymes are required for assembly of the R3-type core





588 oligosaccharide in the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem*  
589 **279**: 31237-31250.

590 Kaser, A., Zeissig, S., and Blumberg, R.S. (2010) Inflammatory bowel disease. *Annu Rev*  
591 *Immunol* **28**: 573-621.

592 Kovacicova, G., and Skorupski, K. (2002) The alternative sigma factor sigma(E) plays an  
593 important role in intestinal survival and virulence in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **70**:  
594 5355-5362.

595 Krause, D.O., Little, A.C., Dowd, S.E., and Bernstein, C.N. (2010) Complete genome  
596 sequence of adherent invasive *Escherichia coli* UM146 isolated from Ileal Crohn's  
597 disease biopsy tissue. *J Bacteriol* **193**: 583.

598 Kulesus, R.R., Diaz-Perez, K., Slechta, E.S., Eto, D.S., and Mulvey, M.A. (2008) Impact of  
599 the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic  
600 *Escherichia coli*. *Infect Immun* **76**: 3019-3026.

601 Leipold, M.D., Vinogradov, E., and Whitfield, C. (2007) Glycosyltransferases involved in  
602 biosynthesis of the outer core region of *Escherichia coli* lipopolysaccharides exhibit  
603 broader substrate specificities than is predicted from lipopolysaccharide structures. *J*  
604 *Biol Chem* **282**: 26786-26792.

605 Lucchini, S., Liu, H., Jin, Q., Hinton, J.C., and Yu, J. (2005) Transcriptional adaptation of  
606 *Shigella flexneri* during infection of macrophages and epithelial cells: insights into the  
607 strategies of a cytosolic bacterial pathogen. *Infect Immun* **73**: 88-102.

608 Martin, H.M., Campbell, B.J., Hart, C.A., Mpofo, C., Nayar, M., Singh, R., Englyst, H.,  
609 Williams, H.F., and Rhodes, J.M. (2004) Enhanced *Escherichia coli* adherence and  
610 invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* **127**: 80-93.

611 Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M., Gonzalez-Huix, F., Lopez-Oliu, C.,  
612 Dahbi, G., Blanco, J.E., Blanco, J., Garcia-Gil, L.J., and Darfeuille-Michaud, A.  
613 (2009a) Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: New ecological  
614 evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease.  
615 *Inflamm Bowel Dis*.

616 Martinez-Medina, M., Naves, P., Blanco, J., Aldeguer, X., Blanco, J.E., Blanco, M., Ponte,  
617 C., Soriano, F., Darfeuille-Michaud, A., and Garcia-Gil, L.J. (2009b) Biofilm  
618 formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC).  
619 *BMC Microbiol* **9**: 202.

620 Meccas, J., Welch, R., Erickson, J.W., and Gross, C.A. (1995) Identification and  
621 characterization of an outer membrane protein, OmpX, in *Escherichia coli* that is



622 homologous to a family of outer membrane proteins including Ail of *Yersinia*  
623 *enterocolitica*. *J Bacteriol* **177**: 799-804.

624 Miquel, S., Claret, L., Bonnet, R., Dorboz, I., Barnich, N., and Darfeuille-Michaud, A.  
625 (2010a) Role of decreased levels of Fis histone-like protein in Crohn's disease-  
626 associated adherent invasive *Escherichia coli* LF82 bacteria interacting with intestinal  
627 epithelial cells. *J Bacteriol* **192**: 1832-1843.

628 Miquel, S., Peyretailade, E., Claret, L., de Vallee, A., Dossat, C., Vacherie, B., Zineb el, H.,  
629 Segurens, B., Barbe, V., Sauvanet, P., Neut, C., Colombel, J.F., Medigue, C., Mojica,  
630 F.J., Peyret, P., Bonnet, R., and Darfeuille-Michaud, A. (2010b) Complete genome  
631 sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS*  
632 *One* **5**.

633 Missiakas, D., Betton, J.M., and Raina, S. (1996) New components of protein folding in  
634 extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Mol*  
635 *Microbiol* **21**: 871-884.

636 Missiakas, D., Mayer, M.P., Lemaire, M., Georgopoulos, C., and Raina, S. (1997) Modulation  
637 of the *Escherichia coli* sigmaE (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the  
638 RseA, RseB and RseC proteins. *Mol Microbiol* **24**: 355-371.

639 Nash, J.H., Villegas, A., Kropinski, A.M., Aguilar-Valenzuela, R., Konczyk, P., Mascarenhas,  
640 M., Ziebell, K., Torres, A.G., Karmali, M.A., and Coombes, B.K. (2010) Genome  
641 sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis  
642 with other *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics* **11**: 667.

643 Naves, P., del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J., Rodriguez-Cerrato, V.,  
644 Ponte, M.C., and Soriano, F. (2008) Measurement of biofilm formation by clinical  
645 isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *J Appl Microbiol* **105**: 585-590.

646 Niu, C., and Gilbert, E.S. (2004) Colorimetric method for identifying plant essential oil  
647 components that affect biofilm formation and structure. *Appl Environ Microbiol* **70**:  
648 6951-6956.

649 Rezuchova, B., Miticka, H., Homerova, D., Roberts, M., and Kormanec, J. (2003) New  
650 members of the *Escherichia coli* sigmaE regulon identified by a two-plasmid system.  
651 *FEMS Microbiol Lett* **225**: 1-7.

652 Rhodius, V.A., Suh, W.C., Nonaka, G., West, J., and Gross, C.A. (2006) Conserved and  
653 variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS Biol* **4**: e2.

654 Rolhion, N., Barnich, N., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2005) Strong decrease in  
655 invasive ability and outer membrane vesicle release in Crohn's disease-associated



656 adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 with the *yfgL* gene deleted. *J Bacteriol*  
657 **187**: 2286-2296.

658 Rolhion, N., Carvalho, F.A., and Darfeuille-Michaud, A. (2007) OmpC and the sigma(E)  
659 regulatory pathway are involved in adhesion and invasion of the Crohn's disease-  
660 associated *Escherichia coli* strain LF82. *Mol Microbiol* **63**: 1684-1700.

661 Rolhion, N., Barnich, N., Bringer, M.A., Glasser, A.L., Ranc, J., Hebuterne, X., Hofman, P.,  
662 and Darfeuille-Michaud, A. (2010) Abnormally expressed ER stress response  
663 chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive *Escherichia coli* invasion. *Gut*.

664 Rouviere, P.E., De Las Penas, A., Meccas, J., Lu, C.Z., Rudd, K.E., and Gross, C.A. (1995)  
665 *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, sigma E, in *Escherichia*  
666 *coli*. *Embo J* **14**: 1032-1042.

667 Sandlin, R.C., Goldberg, M.B., and Maurelli, A.T. (1996) Effect of O side-chain length and  
668 composition on the virulence of *Shigella flexneri* 2a. *Mol Microbiol* **22**: 63-73.

669 Sasaki, M., Sitaraman, S.V., Babbin, B.A., Gerner-Smidt, P., Ribot, E.M., Garrett, N., Alpern,  
670 J.A., Akyildiz, A., Theiss, A.L., Nusrat, A., and Klapproth, J.M. (2007) Invasive  
671 *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest* **87**: 1042-1054.

672 Strober, W., Fuss, I., and Mannon, P. (2007) The fundamental basis of inflammatory bowel  
673 disease. *J Clin Invest* **117**: 514-521.

674 Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M.,  
675 Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M., and Lochs, H. (2002) Mucosal  
676 flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**: 44-54.

677 Swidsinski, A., Weber, J., Loening-Baucke, V., Hale, L.P., and Lochs, H. (2005) Spatial  
678 organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory  
679 bowel disease. *J Clin Microbiol* **43**: 3380-3389.

680 Valdivia, R.H., Hromockyj, A.E., Monack, D., Ramakrishnan, L., and Falkow, S. (1996)  
681 Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen  
682 interactions. *Gene* **173**: 47-52.

683 Welch, R.A., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles,  
684 E.L., Liou, S.R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G.F., Rose, D.J., Zhou,  
685 S., Schwartz, D.C., Perna, N.T., Mobley, H.L., Donnenberg, M.S., and Blattner, F.R.  
686 (2002) Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of  
687 uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 17020-17024.

688 Xavier, R.J., and Podolsky, D.K. (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel  
689 disease. *Nature* **448**: 427-434.



690 **Figures legends**

691 **Figure 1:** Activation of  $\sigma^E$  pathway in AIEC strain LF82 and non pathogenic *E. coli*  
692 strain MG1655. Fold variation of *rpoE* mRNA levels in wild-type strains LF82 (A) and  
693 MG1655 (B) grown in media at pH = 6, in media with 2% of bile salts, in media with 20 g.L<sup>-1</sup>  
694 of NaCl, or adherent to I-407 epithelial cells, relative to that of wild-type strains grown in  
695 classic media. 16S rRNA levels were measured as controls. Data are mean  $\pm$  SEM of three  
696 separate experiments. \*  $P < 0.05$ . C. Adhesion of AIEC strain LF82 and non pathogenic *E.*  
697 *coli* K-12 strain MG1655 to Intestine-407 cells. Cell-associated bacteria were quantified after  
698 a 3 h infection period. Each value is the mean number of CFU  $\pm$  SEM of at least four separate  
699 experiments.

700  
701 **Figure 2:** Identification of AIEC strain LF82  $\sigma^E$  specific regulon. A. Sequence logos  
702 of  $\sigma^E$  promoter motifs. Motifs were identified upstream of the 28 mapped transcription starts  
703 in *E. coli* K-12 strain MG1655, and sequence logos (<http://weblogo.berkeley.edu/>; (Crooks *et*  
704 *al.*, 2004)) of the -35, -10, and +1 start site motifs and the A/T rich UP sequences were  
705 indicated. B. mRNA levels of genes belonging to the *in silico* predict  $\sigma^E$  specific regulon in  
706 AIEC strain LF82. Results are expressed as fold variations in LF82 strain overexpressing the  
707 inhibitory complex RseA-RseB of the  $\sigma^E$  pathway, relative to that of wild-type strain. 16S  
708 rRNA levels were measured as controls. Data are mean  $\pm$  SEM of three separate experiments.  
709 \* $P < 0.05$ .

710  
711 **Figure 3:** Involvement of the  $\sigma^E$ -mediated pathway in the ability of LF82 to interact  
712 with host cells and to form biofilm. Adhesion (A) and invasion (B) abilities of LF82, LF82 +  
713 pBAD24-*rseAB* and LF82- $\Delta$ ORF1, LF82- $\Delta$ *waaW* + pBAD24-*waaWVL* and LF82- $\Delta$ *ychH*  
714 mutants with intestinal epithelial cells I-407. Each value is the mean  $\pm$  SEM of at least four  
715 separate experiments. \* $P < 0.05$ .

716  
717 **Figure 4:** A. Specific biofilm formation (SBF) index of AIEC strain LF82 and non  
718 pathogenic MG1655 *E. coli* strain, with or without RseAB overexpression. Data are mean  $\pm$   
719 SEM of three separate experiments. \*\*\*  $P < 0.001$ . B. Confocal analysis of LF82, LF82 +  
720 pBAD24-*rseAB* and MG1655 biofilm formation at the surface of PFA-fixed monolayer of  
721 intestinal epithelial cells I-407. Bacteria expressing GFP were used, actin is labeled in red  
722 with phalloidin-TRITC and nuclei are labeled with Hoescht in blue. Representative z-sections





723 were visualized under each confocal slice. Bar, 50  $\mu\text{m}$ . **C.** Competitive index of LF82 +  
724 pBAD24-*rseAB* strain compared to that of LF82 wild type strain. Intestinal ileal loops were  
725 inoculated by mixed inoculums comprising equivalent numbers of wild-type and LF82  
726 pBAD24-*rseAB* strain, and their presence was compared after 24h by competitive index (CI)  
727 analysis, which provides a sensitive measurement of the relative degree of attenuation.

728

729 **Figure 5:** Involvement of the *waaWVL* operon in biofilm formation **A.** Specific  
730 biofilm formation (SBF) index of AIEC strain LF82, LF82 + pBAD24-*rseAB* and LF82-  
731  $\Delta\text{ORF1}$ , LF82- $\Delta\text{waaW}$  + pBAD24-*waaWVL* and LF82- $\Delta\text{ychH}$  mutants. Data are mean  $\pm$   
732 SEM of three separate experiments. \*\*  $P < 0.01$ . **B.** Confocal analysis of LF82 and LF82-  
733  $\Delta\text{waaWVL}$  + pBAD24-*waaWVL* biofilm formation at the surface of PFA-fixed monolayer of  
734 intestinal epithelial cells I-407. Bacteria expressing GFP were used, actin is labeled in red  
735 with phalloidin-TRITC and nuclei are labeled with Hoescht in blue. Bar, 50  $\mu\text{m}$ . **C.**  
736 Competitive index of LF82- $\Delta\text{waaWVL}$  + pBAD24-*waaWVL* strain compared to LF82 wild  
737 type strain. Intestinal ileal loops were inoculated by mixed inoculums comprising equivalent  
738 numbers of wild-type and LF82- $\Delta\text{waaWVL}$  + pBAD24-*waaWVL* strain, and their presence  
739 was compared after 24h by competitive index (CI) analysis, which provides a sensitive  
740 measurement of the relative degree of attenuation. \*\*\*  $P < 0.001$ .

741

742 **Figure 6:** Involvement of the *waaWVL* operon in biofilm formation of UPEC and  
743 APEC strains. Specific biofilm formation (SBF) index of UPEC strains CFT073, 536, UTI89  
744 and APEC strain 01, and of the  $\Delta\text{waaW}$  + pBAD24-*waaWVL* constructions. Data are mean  $\pm$   
745 SEM of four separate experiments. \* $P < 0.05$ .



746 **Supplemental figures legends**

747 **Figure S1:** Growth (A) and viability (B) of the wild-type strain LF82 and of LF82-  
748  $\Delta$ ORF1, LF82- $\Delta$ *waaW* + pBAD24-*waaWVL*, and LF82- $\Delta$ ORF1 isogenic mutants in cell  
749 culture medium (MEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS). Data are mean  $\pm$  SEM  
750 of three separate experiments.

751

752 **Figure S2:** Fold variation of *rpoE* mRNA levels in LF82 and MG1655 strains  
753 overexpressing the  $\sigma^E$  inhibitory complex RseA-RseB, relative to that of wild-type strains,  
754 using RT-PCR. 16S rRNA levels were measured as controls. Data are mean  $\pm$  SEM of three  
755 separate experiments. \*  $P < 0.05$ .

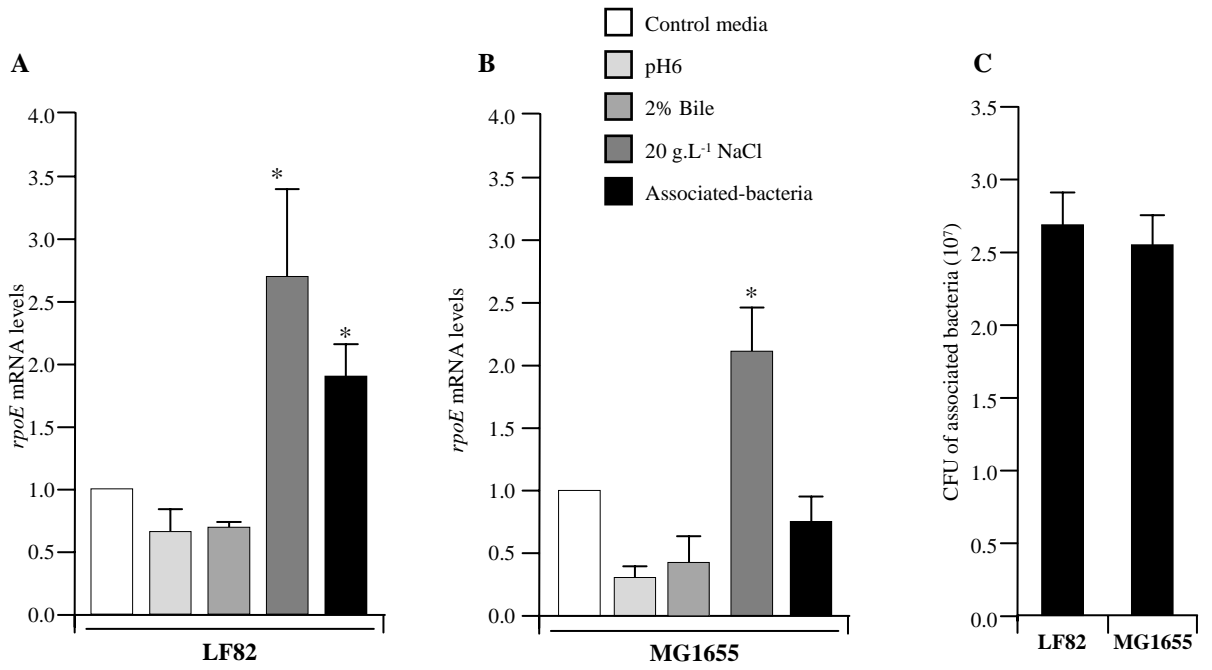
756

757 **Figure S3:** Specific biofilm formation (SBF) index of K-12 strain MG1655, MG1655  
758 + pBAD24 and MG1655 + pBAD24- *waaWVL*. Data are mean  $\pm$  SEM of four separate  
759 experiments.

760

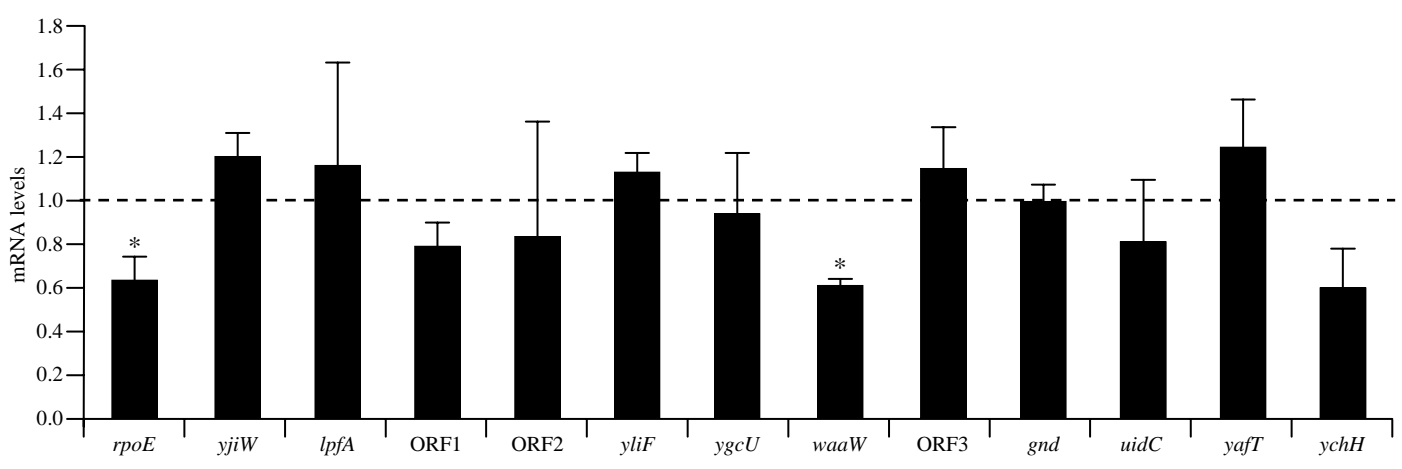
761 **Figure S4: A.** Genetic organization of the *waa* genomic region of AIEC strain LF82,  
762 and comparison with *waa* region of AIEC strains NRG 857C and UM146, UPEC strains  
763 CFT073, UTI89 and 536, and APEC strains 01. Genes are shown as arrows with patterns  
764 representing their putative function: *waaW*: LPS alpha1,2-galactosyl transferase, *waaV* : beta  
765 1,3-glucosyltransferase, and *waaL*: lipid A-core surface polymerligase. Red arrow represents  
766 location of the  $\sigma^E$  fixation site. **B.** The proteins encoded by the AIEC LF82 *waaWVL* operon,  
767 some of their features and nucleotide comparison are listed in the table.





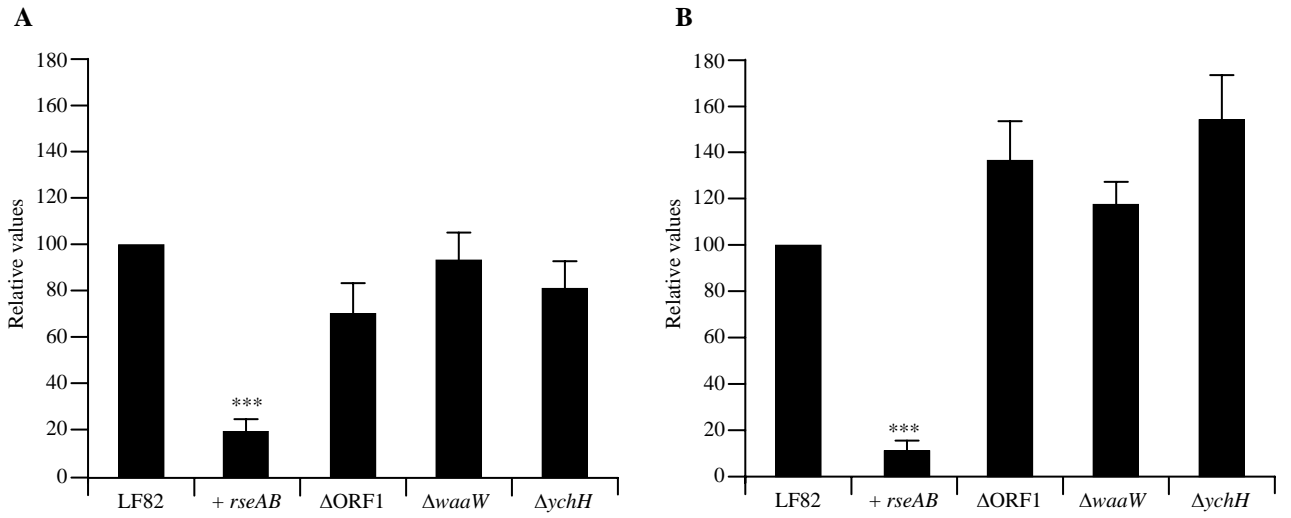
**Figure 1.**



**A****B****Figure 2.**

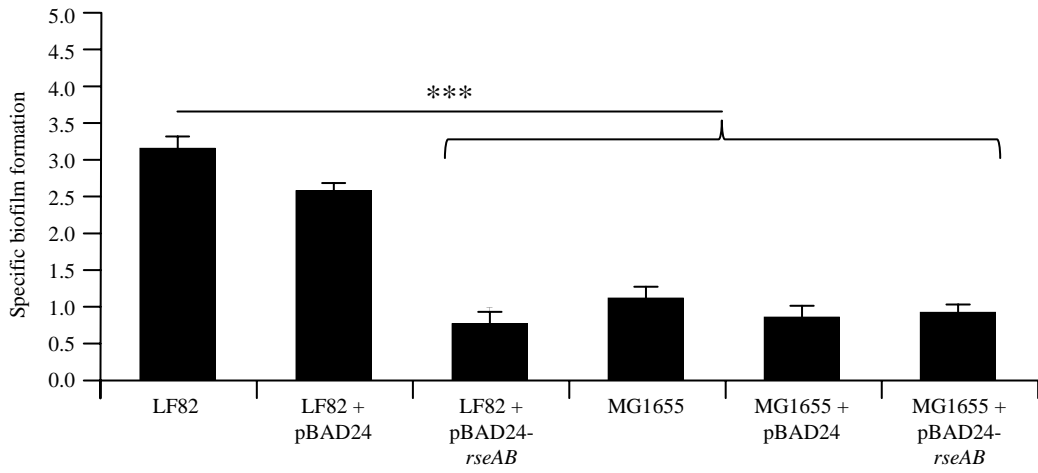
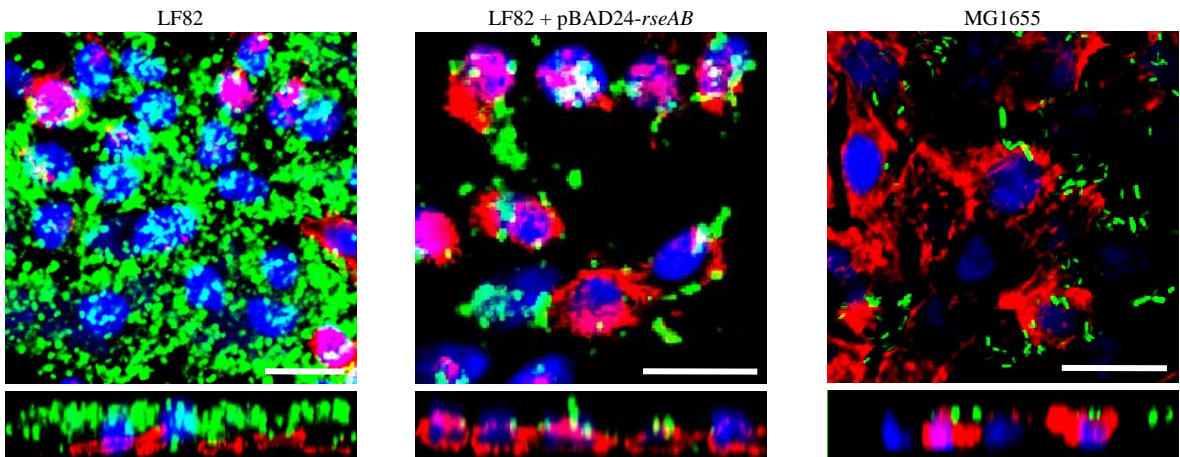
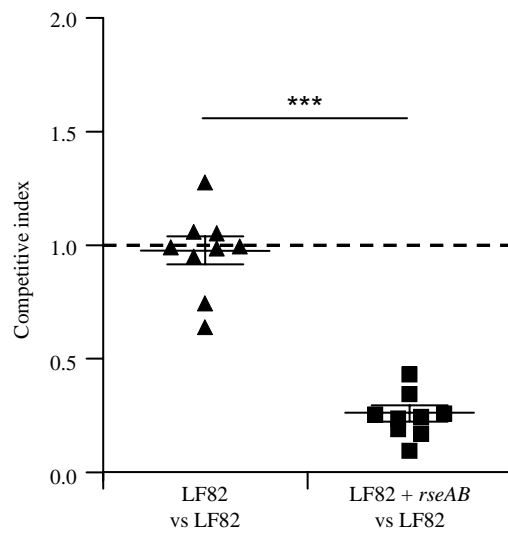




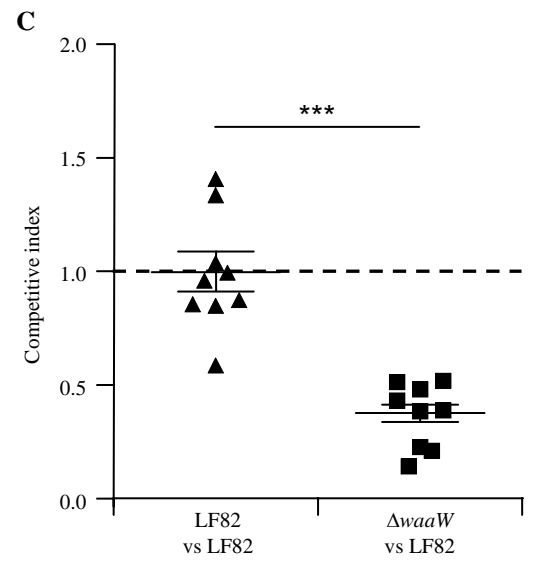
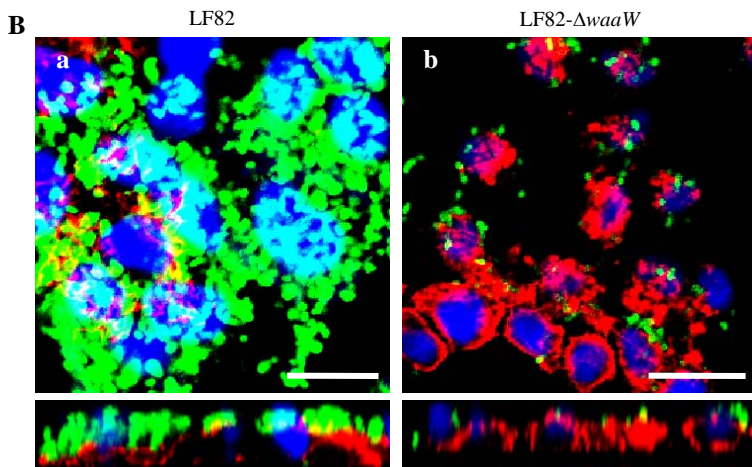
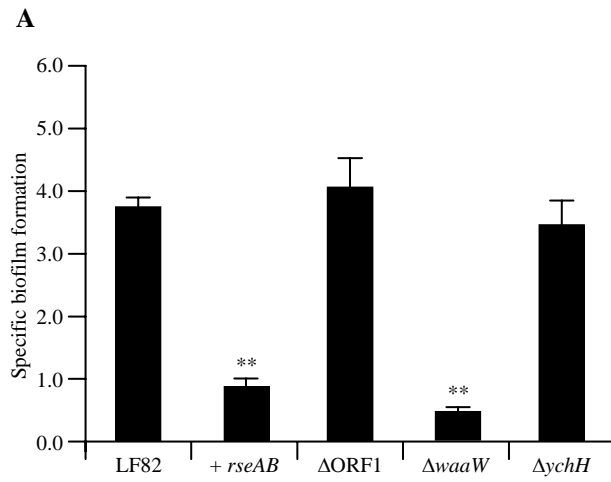


**Figure 3.**



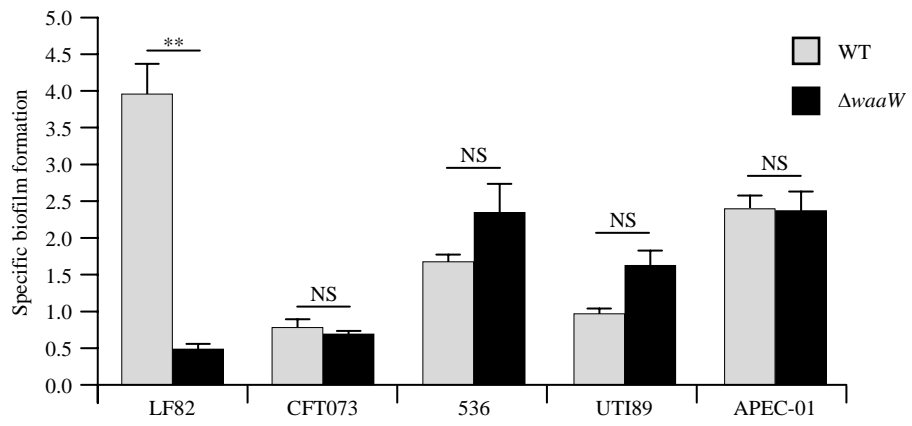
**A****B****C****Figure 4.**





**Figure 5.**

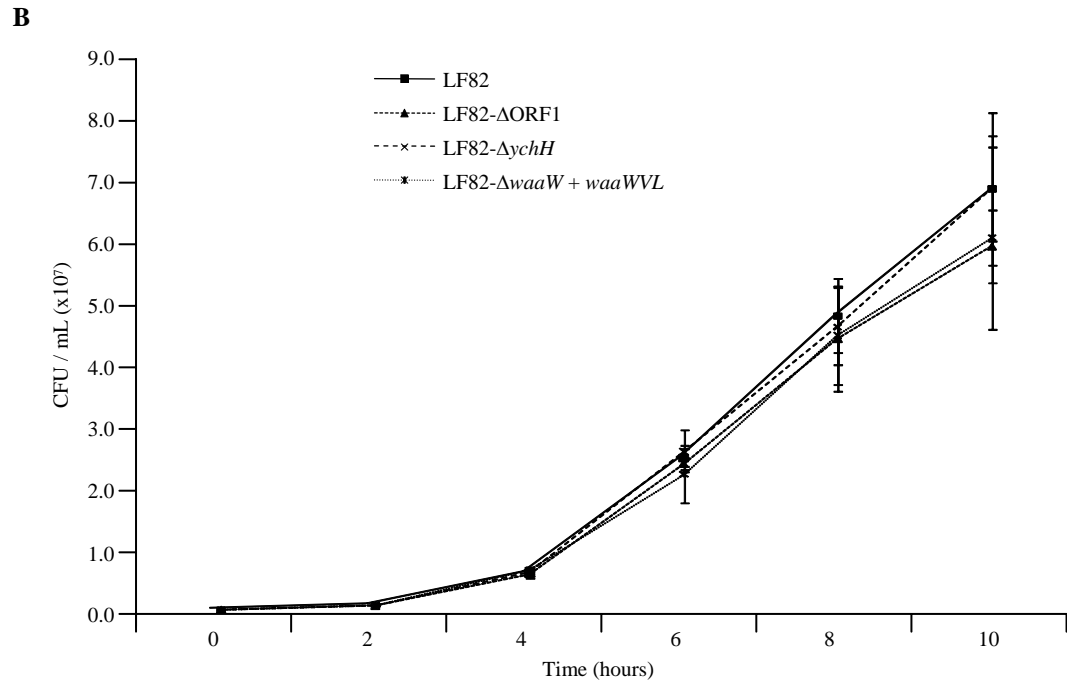
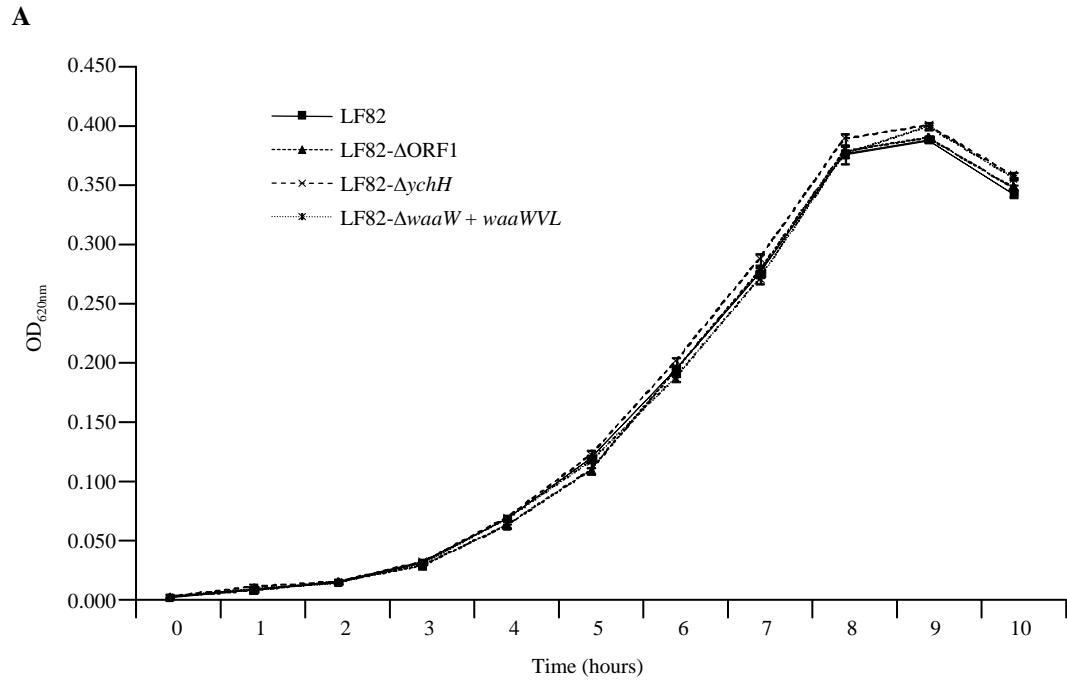




**Figure 6.**

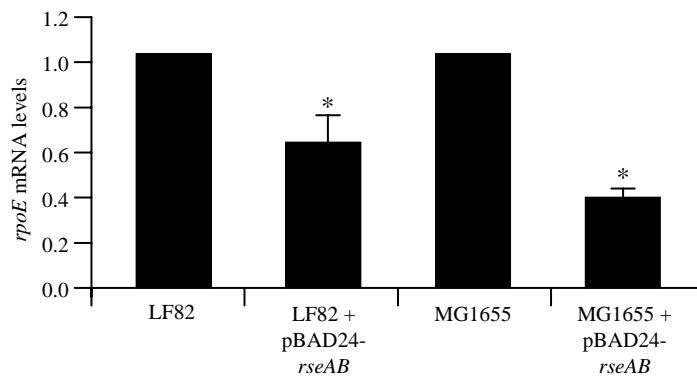






**Figure S1.**





**Figure S2.**



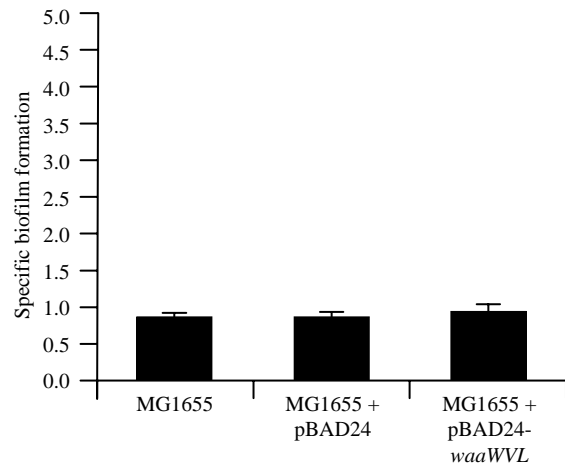
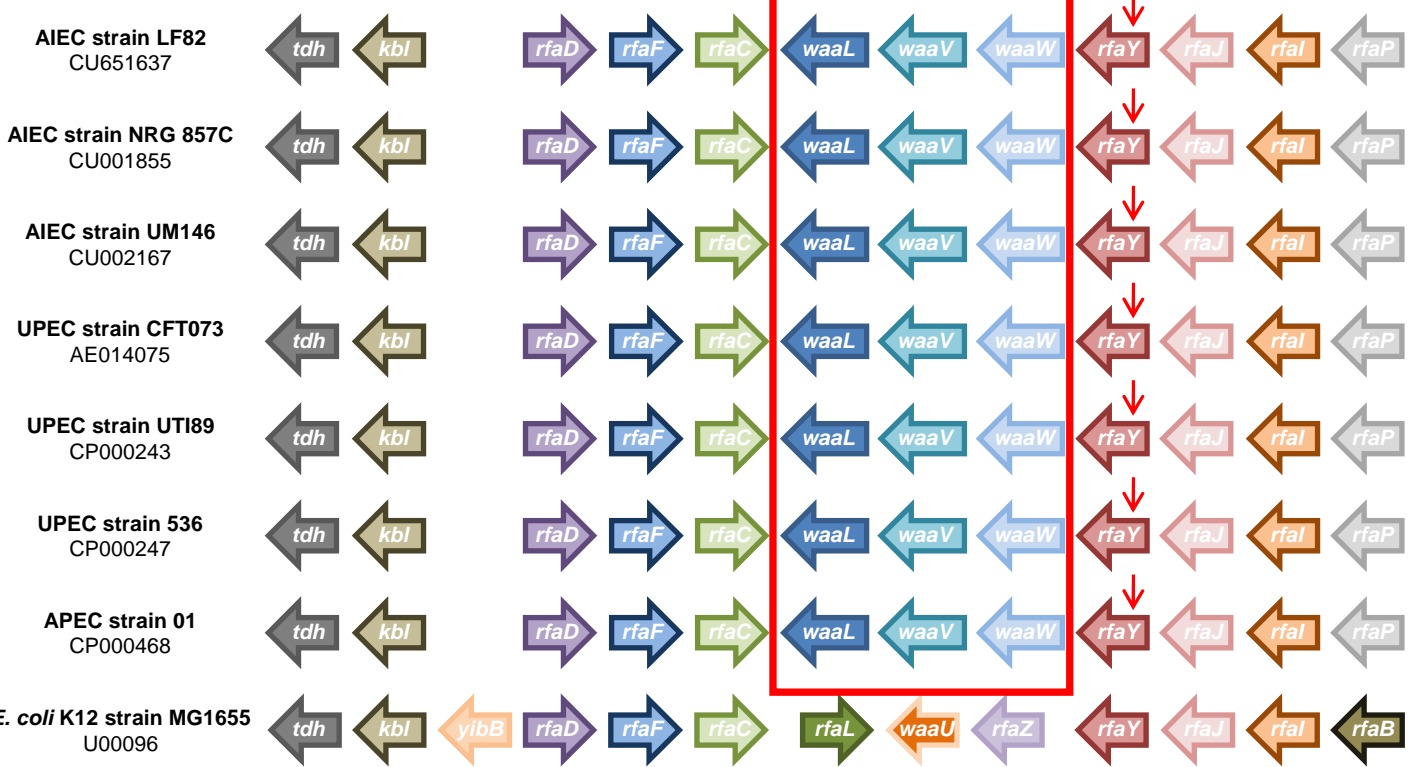


Figure S3.



**A**



**B**

Protein	Putative fonction	Amino acids	Theoretical mass (kDa)	% identity (% similarity) to LP fimbrial operon of:					
				AIEC			UPEC		APEC
				NRG 857C	UM146	CFT073	UTI89	536	01
WaaW	LPS alpha1,2-galactosyl transferase	342	39.5	100	99	99	99	100	99
WaaV	Beta1,3-glucosyltransferase	327	38.6	100	99	99	99	100	99
WaaL	Lipid A-core surface polymerligase	417	46.8	100	99	99	99	99	99

**Figure S4.**





**Table 1.** Specific RpoE regulon of *E. coli* K12 strain MG1655 compared to Adherent-Invasive *E. coli* strain LF82.

N°	Transcription unit	Localization	Presence in AIEC strain LF82	HMMER-score	Protein function	RpoE promoter sequence
1	<i>yjfO</i>	2764666/2764732	-	5.46	Hypothetical protein from prophage CP4-57	<b>CCTGAACTACGCACCATTGAAGGTGTCTTAAAAAGTAA</b>
2	<i>ybfG</i>	715860/715926	-	4.73	Hypothetical protein	<b>AAGGAACTTAATATTTAAAAAATGTTCCATACAATTC</b>
3	<i>bacA</i>	3202193/3202259	+	4.44	Phosphatase	<b>GTAAACCAAACGGTTATAACCTGGTCATACGCAGTAG</b>
4	<i>insH</i>	3651409/3651474	-	3.96	Transposase	<b>GTATGAAAGATTGGTTATCCTGGCCTCTAAAAATTTAA</b>
5	<i>araE</i>	2980372/2980437	+	3.69	Arabinose transporter	<b>TAATGAACTTTATGAATTTTATCTGCTGTAAAATTAGG</b>
6	<i>ygcJ</i>	2879889/2879955	-	3.22	Hypothetical protein	<b>TGGTGAACGTTTTGACCAAAAAATCATCGATAAGACAT</b>
7	<i>yraH</i>	3285300/3285365	-	2.42	Hypothetical adhesin	<b>ATCTTAAAGTTCAGTCTATTTAATGTTCAATGAAATAT</b>
8	<i>matA</i>	310641/310706	+	1.34	Hypothetical regulatory protein	<b>ATCGAAAATAATTAACCTAATCTCGTTTAAACCTTTAT</b>
9	<i>livK</i>	3595759/3595824	+	1.30	Periplasmique protein	<b>AAAGGCACTTTTTCTGTTTATCTATCAATAAATTCAG</b>
10	<i>rutR</i>	1073295/1073360	+	1.14	Transcriptionnal regulator	<b>ATCTAAAATATCTGGTAAAAAGTGGACTAAACGGTCAA</b>
11	<i>puuA</i>	1359058/1359123	-	1.12	Protein involved in the synthesis of gamma-Glu-putrescine	<b>AAATGACCTTTATGTTCAATATTTTTTCAATCTAGCAG</b>
12	<i>yfeN</i>	2522140/2522206	+	1.12	Outer membrane protein	<b>CTTAAACCTTCCGCCATATTGGTAATCGCAGAGACCGC</b>
13	<i>ydiY</i>	1804272/1804336	+	1.04	Hypothetical membrane protein	<b>TATTTAAAATTTTGCAGATAAATATATATAAATAAAAA</b>



**Table 2.** Specific RpoE regulon of Adherent-Invasive *E. coli* strain LF82 compared to *E. coli* K12 strain MG1655.

N°	Transcription unit	Localization	Presence in K12 strain MG1655	HMMER-score	Protein function	RpoE promoter sequence
1	<i>yjiW</i>	4707553/4707620	+	5.05	Hypothetical endonuclease	<b>TGAAATTATGGATTATTTATAACTCTAAAGAGTCA</b>
2	<i>lpfABCDE</i>	3761291/3761358	-	3.55	<i>Long Polar Fimbriae</i> encoding operon	<b>TCAACTTATTGCAAAAATTAATATTCAGTAAAAATAA</b>
3	ORF 1	1494961/1495026	-	3.00	Hypothetical protein, function unknown, with a putative DNA binding homeodomain	<b>CGAAAACCTAAAAAATAATGCGTCAGATCTGATAAA</b>
4	ORF 2	2127613/2127679	-	2.40	Hypothetical protein with unknown function, and with signal peptide and 5 transmembranaire domains	<b>TTAAAAAATTAGTCCCTTCGATTGTCTCTACAGGTGTT</b>
5	<i>yliF</i>	826377/826442	+	1.74	Hypothetical diguanylate cyclase	<b>GGAAATTGGCGAACTATTCCTGGTCTATCAACCGATTG</b>
6	<i>ygcU</i>	2876616/2876679	+	1.54	Hypothetical deshydrogenase	<b>GGAAATGATTGAAAAACAGGGGGTCGAAGTTGAT</b>
7	<i>waaWVL</i>	3845291/3845359	+	1.53	Involved in LPS biosynthesis	<b>TGAAATACTGGCCTATAATTTTAAAACAGTAAAAGTAT</b>
8	ORF 3	3121782/3121848	-	1.51	Hypothetical protein with unknown function, and with signal peptide and 2 transmembranaire domains	<b>CGAATTATGCAACAACATTAATATCAAAAAAATAAATTT</b>
9	<i>gnd</i>	2123143/2123209	+	1.30	Gluconate-6-phosphate deshydrogenase	<b>AGAAACATTATCAAAATTAATTTTCAAAAAATATAGG</b>
10	<i>uidC</i>	1670175/1670241	+	1.24	Hypothetical protein with unknown function, and with signal peptide and a transmembranaire domains	<b>TCAACGATATCACTAGTTAATATTCAATAAAAAATAAT</b>
11	<i>yafT</i>	241096/241161	+	1.20	Hypothetical aminopeptidase	<b>TGCACGTTATGATTTTCATTTTCTATTGATTTAATG</b>
12	<i>yehH</i>	1269466/1269531	+	1.15	Hypothetical inner membrane protein	<b>TGAAATAAGGGTTGTAATTGTGATCACACCCGCACATA</b>



**Table 3.** Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains or plasmids	Relevant characteristic(s)	Source or reference
<b>Strains</b>		
LF82	<i>E. coli</i> isolated from an ileal biopsy sample of a patient with CD, Ery <sup>R</sup>	Darfeuille-Michaud <i>et al.</i> , 1998
LF82-ΔORF1	LF82 isogenic mutant with ORF1 gene deleted	This study
LF82-ΔwaaW	LF82 isogenic mutant with <i>waaW</i> gene deleted	This study
LF82-ΔychH	LF82 isogenic mutant with <i>ychH</i> gene deleted	This study
MG1655	<i>E. coli</i> K-12 serotype OR:H48:K-	Laboratory stock
CFT073	UPEC serotype O6:H1:K2	Laboratory stock
CFT073-ΔwaaW	CFT073 isogenic mutant with <i>waaW</i> gene deleted	This study
536	UPEC serotype O6:H31:K15	Laboratory stock
536-ΔwaaW	536 isogenic mutant with <i>waaW</i> gene deleted	This study
UTI89	UPEC serotype O18:H7:K1	Laboratory stock
UTI89-ΔwaaW	UTI89 isogenic mutant with <i>waaW</i> gene deleted	This study
APEC-01	UPEC serotype O45	Laboratory stock
APEC-01-ΔwaaW	APEC-01 isogenic mutant with <i>waaW</i> gene deleted	This study
<b>Plasmids</b>		
pKOBEG	pBAD cloning vector harboring λ phage redγβα operon; Cm <sup>R</sup>	Chaveroche <i>et al.</i> , 2000
pBAD24	<i>E. coli</i> cloning vector, Amp <sup>R</sup>	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pBAD24- <i>rseAB</i>	pBAD24 harboring the 1614-bp XbaI-HindIII fragment containing the entire <i>rseAB</i> operon of LF82	This study
pBAD24- <i>waaWVL</i>	pBAD24 harboring the 3389-bp XbaI-HindIII fragment containing the entire <i>waaWVL</i> operon of LF82	This study
pFPV25.1	Plasmid constitutively expressing GFP	Valdivia <i>et al.</i> , 1996



**Table 4.** Oligonucleotides used and PCR product sizes.

Primer name	Oligonucleotide sequence (5'-3')	PCR product size (bp)	Use
<i>yjiW</i> -1 <i>yjiW</i> -2	TCACCCCAATAAACTCCTGC AACCGTGAGTTATGCGAGTC	200	Isogenic mutant verification, RT-PCR
<i>lpfA</i> -1 <i>lpfA</i> -2	GGCCTTCTTTCAGACGGTA CTGGAAAACCTGCGATATCTCC	200	Isogenic mutant verification, RT-PCR
ORF1-1 ORF1-2	TTATCGGATAACTGGCTGATG TCGTATTAAGCCATTCTTCTG	200	Isogenic mutant verification, RT-PCR
ORF2-1 ORF2-2	GCTAAACCGTGAAGATAGAGT GTCCAATTATGTCGCAATACG	200	Isogenic mutant verification, RT-PCR
<i>yliF</i> -1 <i>yliF</i> -2	CTATCCGGTAACTCACAATC AATAGGAGAAGTGCTCCATTG	200	Isogenic mutant verification, RT-PCR
<i>ygcU</i> -1 <i>ygcU</i> -2	GGTAAAGCCCATGTTGCCG TGAAGATGGCACCCAACACT	200	Isogenic mutant verification, RT-PCR
<i>waaW</i> -1 <i>waaW</i> -2	AATGGCTTTATTCATAAAATCATT AGGCTCATTAGCTGGATTGC	200	Isogenic mutant verification, RT-PCR
ORF3-1 ORF3-2	CCATATCTTTTATCTATAAACCG CCTAAAAAGACAAAAATTATATATA	200	Isogenic mutant verification, RT-PCR
<i>gnd</i> -1 <i>gnd</i> -2	CATCCAGGATCACATCAACC GGTGATATGCAGCTGATTGC	200	Isogenic mutant verification, RT-PCR
<i>uidC</i> -1 <i>uidC</i> -2	CTGGTATTACGACTTAAACCTT CATCGCGCACGTTCTTTTTTA	200	Isogenic mutant verification, RT-PCR
<i>yafT</i> -1 <i>yafT</i> -2	TTCTCTGTAATACTTGTTTCAG TGGCCTTTGCTGCAACAAAA	200	Isogenic mutant verification, RT-PCR
<i>yehH</i> -1 <i>yehH</i> -2	AATGGTGGTCGGCGTGGG TACGGCGGCAACGTTTGTGTC	200	Isogenic mutant verification, RT-PCR
IM ORF2-1 IM ORF2-2	TCGATTAGAGAAAAATTTTCCTTCAACATTATCTACTAAAAAT AATAAAATCCATATGAATATCCTCCTTAG GCTTTAGATGCAATATATAGAGCAAGCGTCAGCACCATTA AAAAATATACGTAGGCTGGAGCTGCTTC	1495	LF82- $\Delta$ ORF2 isogenic mutant construction
IM <i>waaW</i> -1 IM <i>waaW</i> -2	GTACTCATCCTTAATTATTATTGTAACCTCAGACATCCATGA TTTTTATTAGTAGGCTGGAGCTGCTTC TAAAAAATTAAGGCAAAGCGTAAACCACACAGTCAAAA ACGGAACCAACCATATGAATATCCTCCTTAG	1495	LF82- $\Delta$ <i>waaW</i> isogenic mutant construction
IM <i>yehH</i> -1 IM <i>yehH</i> -2	ATAAGGAAGAGGGGTATTCCCTGTTACAACCCAGAAAGTT CCGGAGGTGACATCATATGAATATCCTCCTTAG ATTGACCAGTCAGCGCAAACCTGACTGGTCAGCAAACCTGCA TTATTTGTTAGTAGGCTGGAGCTGCTTC	1495	LF82- $\Delta$ <i>yehH</i> isogenic mutant construction
16S-1 16S-2	ATGACCAGCCCACTGGAAC CTTCCTCCCCGCTGAAAGTA	157	RT-PCR
K1 K2 Kt	CAGTCATAGCCGAATACCCT CGGTGCCCTGAATGAACTGC CGGCCACAGTCGATGAATCC		Kanamycin resistance cassette amplification
XbaI- <i>rseAB</i> HindIII- <i>rseAB</i>	GCTCTAGAGCTAGGCATGCAGAAAGAACAACCTT CCCAAGCTTGGGGATCATTGCGCTGTCCCGAA	1614	Overexpression of RseA and RseB
XbaI- <i>waaWVL</i> HindIII- <i>waaWVL</i>	GCTCTAGAGCATGGATTTATTAGCTGAGAGTATTA CCCAAGCTTGGGCTTATCTAATAAACATTGGTCCGA	3389	Transcomplementation of LF82- $\Delta$ <i>waaWVL</i> isogenic mutant





**Table 5.** The 28 sequences selected to define the motif corresponding to the RpoE binding site.

Sequence N°	Transcription unit	Localisation of the RpoE promoter sequence within MG1655 genome	HMMER-score	+1	RpoE promoter sequence
1	<i>greA</i>	3326872/3326937	9.96	-138	<b>GGA</b> ACTTCAGGGTAAAAATGACTATCAAAATGT <b>Ga</b>
2	<i>yaeT</i>	196963/197029	6.55	-902	<b>GGA</b> ACTAAAAGCCGTAGATGGTATCGAAACGCCT <b>g</b>
3	<i>ygiM</i>	3199002/3199067	5.00	-165	<b>CGA</b> ACTTAATGCGATCTTTTTTGT <b>CAGT</b> AGATA <b>g</b>
4	<i>rpoH</i>	3598890/3598956	4.96	-87	<b>TGA</b> ACTTGTGGATAAAATCACGGTCTGATAAAAC <b>Ca</b>
5	<i>fkpA</i>	3475545/3475610	4.58	-107	<b>GAA</b> ACTAATTTAAACAAAAAGAGTCTGAAAAT <b>Ag</b>
6	<i>rpoE</i>	2708107/2708173	4.49	-76	<b>GGA</b> ACTTTACAAAAACGAGACACTCTAACCCTTT <b>g</b>
7	<i>bacA</i>	3202193/3202259	4.44	-43	<b>TAA</b> ACCAAACGGTTATAACCTGGTCATACGCAGT <b>a</b>
8	<i>yggN</i>	3099819/3099885	4.25	-179	<b>CGA</b> ACTTTTCGACGTTTGGTGGGACTAAGAAA <b>g</b>
9	<i>yfeY</i>	2549261/2549326	4.14	-26	<b>GGC</b> ACTTTTTGGTGAATTTGCACTCCAAGCAAC <b>g</b>
10	<i>clpX</i>	456364/456429	4.09	-224	<b>TGA</b> ACTTATGGCGCTTCATACGGGTCAATCATT <b>g</b>
11	<i>yhjJ</i>	3680036/3680100	4.06	-76	<b>TGAC</b> ATTTTCATGTTCTTGCGGTCTAACACG <b>Aa</b>
12	<i>yfeK</i>	2535274/2535340	3.97	-27	<b>GAA</b> ACTTTACCTGATTCTGGCAGTCAAATCGGC <b>Ta</b>
13	<i>ybfG</i>	715860/715926	3.93	-44	<b>GGA</b> ACTTAATATTTAAAAAATGTTCCATACAAT <b>t</b>
14	<i>ddg</i>	2493540/2493606	3.69	-64	<b>GGA</b> ACCATTGTCGTACATGATGGCCCAACCAATT <b>g</b>
15	<i>yfgM</i>	2636994/2637059	3.54	-323	<b>GGA</b> ACTTGCGCAGCAATTTGTTGACAAAAATG <b>Aa</b>
16	<i>plsB</i>	4254618/4254684	3.41	-132	<b>AGA</b> ACCTTTTTACATTATGAGCGTCAATATCAGT <b>g</b>
17	<i>mdoG</i>	1108415/1108481	3.17	-80	<b>TGA</b> ACGATACCGGATTCTGTTGTCGGAATGGCT <b>g</b>
18	<i>yhbG</i>	3341354/3341423	3.16	-546	<b>GAAA</b> AGGTTAGAACATCCTATGAAATTCAAAACAA <b>a</b>
19	<i>yffO</i>	2764666/2764732	2.94	-186	<b>GGA</b> ACATTTTCGGCCAAAGCCTGATCTAAGCGTT <b>g</b>
20	<i>rseA</i>	2707651/2707717	2.91	-228	<b>CGA</b> ACCCTGAGAACTTAATGTTGTCAGAAGAACT <b>g</b>
21	<i>yeaY</i>	1888581/1888646	2.83	-28	<b>GAA</b> ACTTCCGGGCAAAGAATGAATCTTAAGAGT <b>a</b>
22	<i>htrA</i>	180782/180847	2.72	-40	<b>GGA</b> ACTTCAGGCTATAAAACGAATCTGAAGAAC <b>Ca</b>
23	<i>sixA</i>	2455018/2455082	2.58	-187	<b>GCA</b> ACTGACCTGCAATAAGAAGGTCAAAGCTAT <b>a</b>
24	<i>dsbC</i>	3037652/3037718	2.50	-811	<b>TGA</b> ACGCTTACCCTCGCGATCTGTCAATGATGGT <b>g</b>
25	<i>sbmA</i>	395715/395781	2.43	-85	<b>CGA</b> ACTAAGCGCCTTGCTATGGGTCAATGGGC <b>g</b>
26	<i>yieE</i>	3891788/3891855	2.38	-40	<b>CGA</b> ACTTTTAGCCGCTTTAGTCTGTCCATCATTCC <b>a</b>
27	<i>yraP</i>	3294032/3294097	2.36	-337	<b>TGC</b> ACTAAATACTGATAATGTTGTCTTAACGGC <b>g</b>
28	<i>yfgC</i>	2614028/2614093	2.35	-26	<b>GGA</b> ACGATATTTACAGTATCGGTCAAATGACT <b>a</b>



**Supplemental Table 1.** RpoE-binding sites identified within the K12 strain MG1655 genome using HMMER software program.

Sequence N°	Transcription unit	Localisation of the RpoE promoter sequence within K12 strain MG1655 genome	HMMER-score	RpoE-regulation in AIEC strain LF82
1	<i>greA</i>	3326872/3326937	9.96	+
2	<i>yaeT</i>	196963/197029	6.55	+
3	<i>yiaK</i>	3740681/3740746	6.35	+
4	<i>ydhI</i>	1718959/1719025	5.89	+
5	<i>yjyO</i>	2764666/2764732	5.46	-
6	<i>htrG</i>	3199002/3199067	5.0	+
7	<i>rpoH</i>	3598890/3598956	4.96	+
8	<i>ybfG</i>	715860/715926	4.73	-
9	<i>fkpA</i>	3475545/3475610	4.58	+
10	<i>rpoE</i>	2708107/2708173	4.49	+
11	<i>bacA</i>	3202193/3202259	4.44	-
12	<i>yggN</i>	3099819/3099885	4.25	+
13	<i>yfeY</i>	2549261/2549326	4.14	+
14	<i>clpX</i>	456364/456429	4.09	+
15	<i>yhjJ</i>	3680036/3680100	4.06	+
16	<i>wzb</i>	2135214/2135280	4.02	+
17	<i>yfeK</i>	2535274/2535340	3.97	+
18	<i>insH</i>	3651409/3651474	3.96	-
19	<i>rhtA</i>	849576/849642	3.95	+
20	<i>lpxP</i>	2493540/2493606	3.69	+
21	<i>araE</i>	2980372/2980437	3.69	-
22	<i>yfgL</i>	2636994/2637059	3.54	+
23	<i>plsB</i>	4254618/4254684	3.41	+
24	<i>ycgJ</i>	2879889/2879955	3.22	-
25	<i>focA</i>	954044/954109	3.21	+
26	<i>mdoG</i>	1108415/1108481	3.17	+
27	<i>lptB</i>	3341354/3341423	3.16	+
28	<i>yiiS</i>	4110831/4110897	2.97	+
29	<i>yfiO</i>	2733920/2733985	2.94	+
30	<i>rseA</i>	2707651/2707717	2.91	+
31	<i>yeaY</i>	1888581/1888646	2.83	+
32	<i>htrA</i>	180782/180847	2.72	+
33	<i>cspI</i>	1637050/1637115	2.63	+
34	<i>sixA</i>	2455018/2455082	2.58	+
35	<i>dsbC</i>	3037652/3037718	2.5	+
36	<i>sbmA</i>	395715/395781	2.43	+
37	<i>yraH</i>	3285300/3285365	2.42	-
38	<i>gspA</i>	3453653/3453718	2.39	+
39	<i>yieE</i>	3891788/3891855	2.38	+
40	<i>yraP</i>	3294032/3294097	2.36	+
41	<i>yfgC</i>	2614028/2614093	2.35	+
42	<i>ccmA</i>	2296241/2296307	1.82	+
43	<i>yadH</i>	142764/142830	1.81	+
44	<i>matA</i>	310641/310706	1.34	-
45	<i>ftsZ</i>	104477/104542	1.33	+
46	<i>livK</i>	3595759/3595824	1.3	-
47	<i>rutR</i>	1073295/1073360	1.14	-
48	<i>puuA</i>	1359058/1359123	1.12	-
49	<i>yfeN</i>	2522140/2522206	1.12	-
50	<i>creB</i>	4633516/4633582	1.08	+
51	<i>yfdC</i>	2462835/2462901	1.07	+
52	<i>ydiY</i>	1804272/1804336	1.04	-
53	<i>ygfK</i>	3013237/3013301	1.00	+



**Supplemental Table 2.** RpoE-binding sites identified within the AIEC strain LF82 genome using HMMER software program.

Sequence N°	Transcription unit	Localisation of the RpoE promoter sequence within AIEC strain LF82 genome	HMMER-score	RpoE-regulation in K12 strain MG1655
1	<i>greA</i>	3372668/3372733	7.95	+
2	<i>yaеT</i>	200735/200801	6.55	+
3	<i>ydH</i>	1698352/1698418	5.89	+
4	<i>yaK</i>	3791902/3791966	5.76	+
5	<i>rhtA</i>	803618/803684	5.33	+
6	<i>yjiW</i>	4707553/4707620	5.05	-
7	<i>htrG</i>	3251751/3251816	5.00	+
8	<i>rpoH</i>	3645978/3646044	4.78	+
9	<i>yggN</i>	3101610/3101676	4.68	+
10	<i>fkpA</i>	3520641/3520706	4.58	+
11	<i>rpoE</i>	2687777/2687843	4.49	+
12	<i>clpX</i>	460441/460506	4.09	+
13	<i>yhjJ</i>	3727218/3727282	4.06	+
14	<i>wzb</i>	2153427/2153493	4.02	+
15	<i>lpxP</i>	2492804/2492870	3.79	+
16	<i>yiiS</i>	4177373/4177439	3.57	+
17	<i>yfeK</i>	2533047/2533113	3.56	+
18	<i>lpfA</i>	3761291/3761358	3.55	-
19	<i>yfgL</i>	2622427/2622492	3.54	+
20	<i>yfeY</i>	2543689/2543755	3.52	+
21	<i>plsB</i>	4333541/4333607	3.41	+
22	<i>lptB</i>	3387011/3387080	3.16	+
23	ORF 1	1494961/1495026	3.00	-
24	<i>yfiO</i>	2716042/2716107	2.94	+
25	<i>rseA</i>	2687321/2687387	2.91	+
26	<i>yeaY</i>	1854523/1854588	2.83	+
27	<i>mdoG</i>	1085849/1085914	2.66	+
28	<i>yraP</i>	3340435/3340500	2.66	+
29	<i>cspI</i>	1611621/1611686	2.63	+
30	<i>focA</i>	913829/913894	2.55	+
31	<i>dsbC</i>	3040635/3040701	2.50	+
32	<i>sbmA</i>	400038/400104	2.43	+
33	ORF 2	2127613/2127679	2.40	
34	<i>creB</i>	4766608/4766674	2.36	+
35	<i>yfgC</i>	2587799/2587864	2.35	+
36	<i>yieE</i>	3940498/3940565	2.04	+
37	<i>ccmA</i>	2313122/2313188	1.82	+
38	<i>yadH</i>	147757/147823	1.81	+
39	<i>yliF</i>	826377/826442	1.74	-
40	<i>ygcU</i>	2876616/2876679	1.54	-
41	<i>waaWVL</i>	3845291/3845359	1.53	-
42	ORF 3	3121782/3121848	1.51	-
43	<i>ygfK</i>	3016221/3016285	1.48	+
44	<i>htrA</i>	185564/185629	1.34	+
45	<i>ftsZ</i>	105685/105750	1.33	+
46	<i>gnd</i>	2123143/2123209	1.30	-
47	<i>sixA</i>	2466041/2466105	1.29	+
48	<i>uidC</i>	1670175/1670241	1.24	-
49	<i>yafT</i>	241096/241161	1.20	-
50	<i>yehH</i>	1269466/1269531	1.15	-
51	<i>yfdC</i>	2472315/2472381	1.07	+
52	<i>gspA</i>	3498740/3498805	1.00	+



## Commentaires de la publication n°1

✓ **La voie de signalisation dépendante du facteur de transcription  $\sigma^E$  est activée lors du processus d'adhésion de la souche AIEC de référence LF82 aux cellules épithéliales intestinales.**

Les observations cliniques révèlent la présence de biofilms bactériens au niveau de la muqueuse intestinale des patients atteints de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (Swidsinski *et al.*, 2005). En parallèle, les souches de AIEC sont fortement associées à la muqueuse iléale des patients atteints de MC (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). Chez la souche AIEC de référence LF82, la forte osmolarité de la lumière intestinale conduit à une surexpression d'OmpC et à une accumulation anormale de protéines dans le périplasme bactérien, entraînant alors l'activation de la voie de signalisation  $\sigma^E$  (Rolhion *et al.*, 2007). L'activation de cette voie de signalisation dépendante du facteur  $\sigma^E$  entraîne l'expression des gènes codant les pili de type 1, les flagelles, mais aussi de facteurs de virulence non identifiés et impliqués dans l'interaction bactérie/cellule (Rolhion *et al.*, 2007). L'implication de la voie de signalisation dépendante du facteur  $\sigma^E$  dans la virulence bactérienne a précédemment été rapportée, notamment pour les bactéries pathogènes *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Humphreys *et al.*, 1999) et *Vibrio cholerae* (Kovacikova and Skorupski, 2002). L'objectif de ce travail était de caractériser l'implication de la voie  $\sigma^E$  dans le phénotype des souches AIEC, et notamment dans leur pouvoir d'interaction avec les cellules épithéliales de l'hôte. L'étude de l'activation de la voie  $\sigma^E$  a été étudiée en milieux de culture mimant les conditions gastro-intestinales, ainsi que lors du processus d'adhésion bactérienne, et nous avons pu montrer qu'une forte osmolarité active la voie de signalisation dépendante du facteur de transcription  $\sigma^E$  chez les souches AIEC LF82 et K-12 MG1655, et ce à un niveau similaire. De manière intéressante, lors du processus d'adhésion, seule la souche AIEC LF82 présente une activation de la voie de signalisation dépendante du facteur de transcription  $\sigma^E$ , et ceci malgré un pouvoir d'adhésion similaire entre les souches AIEC LF82 et K-12 MG1655. Ainsi, il existerait chez la souche AIEC de référence LF82 un mécanisme original d'activation de la voie de transcription impliquant le facteur  $\sigma^E$  en réponse au processus d'adhésion.





✓ **La voie de signalisation dépendante du facteur de transcription  $\sigma^E$  est impliquée dans la capacité de la souche AIEC LF82 à adhérer et à envahir les cellules épithéliales intestinales, ainsi que dans sa capacité à former des biofilms**

Nous avons pu montrer que la voie  $\sigma^E$  est fortement impliquée dans l'interaction des bactéries AIEC avec les cellules épithéliales intestinales, car l'inhibition de cette voie conduit à une forte diminution du pouvoir d'adhésion et d'invasion de la souche LF82, ce qui n'est pas observé pour la souche de *E. coli* non pathogène K-12 MG1655. Cette diminution drastique du pouvoir d'adhésion et d'invasion est à corrélérer avec la forte diminution de l'expression des pili de type 1 et des flagelles suite à l'inhibition de la voie  $\sigma^E$ , ces deux facteurs jouant un rôle majeur dans ce phénotype (Barnich *et al.*, 2003; Boudeau *et al.*, 2001).

Cette étude s'est par la suite intéressée à un nouveau caractère phénotypique récemment décrit pour les souches AIEC. En effet, Martinez-Medina et coll. ont récemment démontré que les souches AIEC avaient une capacité augmentée à former des biofilms comparativement aux souches non-AIEC (Martinez-Medina *et al.*, 2009b). Nous avons voulu déterminer si la voie de signalisation  $\sigma^E$  pouvait être impliquée dans la capacité à former des biofilms par la souche AIEC de référence LF82, et nous avons pu montrer que l'inhibition de cette voie de signalisation via la surexpression du complexe d'inhibition RseA-RseB aboutit à une diminution drastique de la formation de biofilm par la souche AIEC LF82. Une même inhibition chez la souche K-12 MG1655 ne conduit à aucune diminution de sa capacité à former des biofilms, et ceci n'est pas surprenant puisque la souche MG1655 présente un pouvoir de formation de biofilm faible et similaire à celui observé pour la souche LF82 présentant une inhibition de la voie  $\sigma^E$ .

Lors de cette étude, nous avons mis au point un modèle original d'étude de la formation de biofilm bactérien, montrant que l'inhibition de la voie de signalisation  $\sigma^E$  conduit à une diminution drastique de la formation de biofilms par la souche AIEC de référence LF82 à la surface des cellules épithéliales intestinales. De plus, l'étude de la colonisation de la muqueuse intestinale en modèle d'anses ligaturées iléales chez la souris montre que l'inhibition de la voie de signalisation  $\sigma^E$  entraîne une très forte diminution de la colonisation de la muqueuse par les bactéries LF82.



✓ **L'analyse *in silico* du régulon  $\sigma^E$  permet l'identification de facteurs spécifiquement régulés chez la souche AIEC de référence LF82 comparativement à la souche de *E. coli* non pathogène K-12 MG1655**

Dans le but d'étudier si l'activation de cette voie de transcription pouvait aboutir à l'expression de facteurs bactériens impliqués dans les caractéristiques phénotypiques des souches AIEC, le génome de la souche AIEC de référence LF82 (Miquel *et al.*, 2010) a été criblé *in silico* dans le but d'identifier l'ensemble du régulon  $\sigma^E$  de cette souche. Pour cela, une séquence consensus de fixation du facteur  $\sigma^E$  à l'ADN a été élaborée grâce aux séquences promotrices de 28 gènes connus pour être sous la dépendance d'une régulation transcriptionnelle par le facteur  $\sigma^E$  (Rhodius *et al.*, 2006). Le criblage bioinformatique réalisé par la suite a permis d'identifier 52 gènes potentiellement sous la dépendance d'une régulation par le facteur  $\sigma^E$  chez la souche AIEC de référence LF82, 12 d'entre eux ne semblant pas appartenir au régulon  $\sigma^E$  de la souche K12 MG1655. Parmi ces 12 gènes ou cadres ouverts de lecture appartenant potentiellement au régulon  $\sigma^E$  uniquement chez la souche AIEC de référence LF82, les analyses expérimentales ont montrées que seuls 3 d'entre eux seraient régulés par ce facteur de transcription : le cadre ouvert de lecture ORF1, l'opéron *waaWVL* et le gène *yehH*. Suite à la création des mutants isogéniques délétés pour ces gènes, les analyses phénotypiques ont montré qu'aucun de ces trois mutants isogéniques n'étaient diminués dans leur capacité d'adhésion et d'invasion. Il est à noter qu'une expression normale des pili de type 1 et des flagelles chez ces trois mutants isogéniques.

L'analyse *in silico* réalisée n'a pas permis d'identifier un site de fixation consensus pour le facteur  $\sigma^E$  en amont des opérons *fim* et du régulon flagellaire, codant respectivement les pili de type 1 et les flagelles. Ainsi, le mécanisme moléculaire à l'origine de la régulation des pili de type 1 et des flagelles par le facteur  $\sigma^E$  reste à élucider. De manière intéressante, il a récemment été mis en évidence chez *Salmonella enterica* serovar Typhi que la voie de signalisation  $\sigma^E$  était impliquée dans l'expression des flagelles en condition d'hyperosmolarité, mais le mécanisme moléculaire à l'origine d'une telle régulation n'est à ce jour pas connu (Du *et al.*, 2011).



✓ **L'opéron *waaWVL* est fortement impliqué dans la formation de biofilms par les souches AIEC.**

Suite à l'observation montrant l'importance de la voie  $\sigma^E$  dans la formation de biofilms par la souche AIEC LF82, l'implication dans ce processus de ces trois facteurs précédemment identifiés comme présentant une régulation par ce facteur de transcription uniquement chez la souche LF82 a été étudiée. Les résultats montrent que l'opéron *waaWVL*, codant trois enzymes impliqués dans la biosynthèse du LPS bactérien, est fortement impliqué dans la formation de biofilm et dans la colonisation de la muqueuse intestinale par la souche LF82. De manière intéressante, la diminution de l'expression de l'opéron *waaWVL* conduit à un phénotype identique à celui observé chez la souche MG1655 sauvage et chez la souche LF82 présentant une inhibition de la voie de signalisation  $\sigma^E$ . L'expression des pili de type 1 et des flagelles restent inchangée suite à l'inhibition de l'expression de l'opéron *waaWVL*, montrant que ces deux facteurs ne sont pas impliqués dans la très forte diminution de formation de biofilm observée. De plus, la diminution de la colonisation de la muqueuse intestinale observée suite à l'inhibition de l'expression de l'opéron *waaWVL* pourrait être liée à la diminution de la formation de biofilm précédemment observée, puisque l'expression des pili de type 1 est normale chez cette souche.

L'opéron *waaWVL* code trois enzymes potentiellement impliquées dans la biosynthèse du lipopolysaccharide bactérien, et notamment dans la synthèse du lipide A et de l'antigène O du LPS. De manière intéressante, de telles enzymes ont précédemment été décrites pour jouer un rôle important dans la structure, la composition, ainsi que dans la longueur du LPS bactérien (Kaniuk *et al.*, 2004; Leipold *et al.*, 2007), ces trois caractéristiques du LPS étant connues pour affecter la virulence de bactéries pathogènes, comme montré pour *Shigella flexneri* (Sandlin *et al.*, 1996). De plus, il a pu être montré que des modifications de la composition ou de la longueur du LPS affecte la formation de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa* (Ciornei *et al.*, 2010) et *Escherichia coli* (Beloin *et al.*, 2006).

Dans cette étude, une analyse par BLAST a indiqué que l'opéron *waaWVL* est retrouvé chez plusieurs souches de *E. coli* appartenant au phylogroupe B2, telles que les souches AIEC de référence NRG857C et UM146, les souches de *E. coli* responsables d'infections urinaires (UPEC) CFT073, UTI89 et 536 ainsi que la souche de *E. coli* aviaire APEC-01. Ainsi, la présence de cet opéron *waaWVL* chez les souches de références des

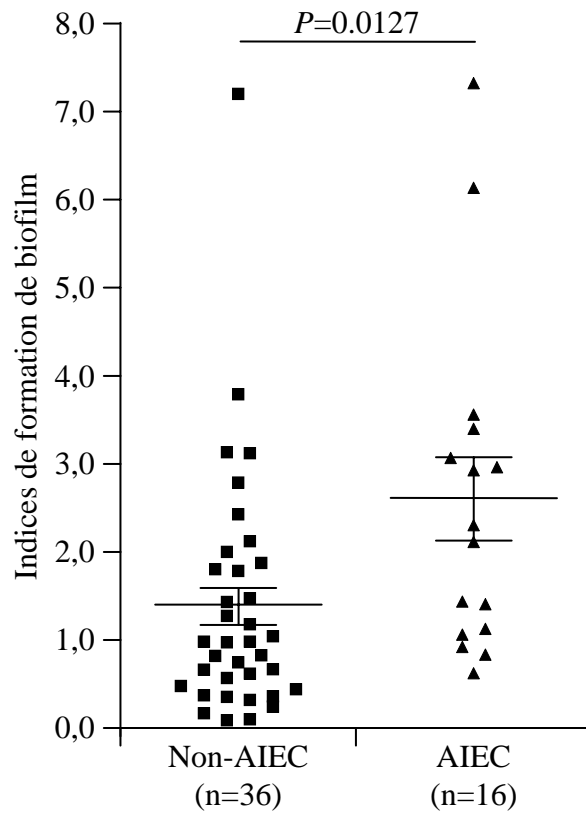


pathovars UPEC et APEC laisse supposer que l'opéron *waaWVL* pourrait être impliqué dans leurs capacités de formation de biofilm, mais les analyses expérimentales conduites ont cependant montré que l'opéron *waaWVL* n'est pas impliqué dans un tel processus. Ceci pourrait être expliqué par la non expression de l'opéron *waaWVL* chez ces souches, mais des expériences complémentaires ayant pour but d'étudier la formation de biofilm suite à la surexpression de cet opéron n'ont pas permis de montrer une modification de la formation de biofilm chez les souches APEC et UPEC. Ainsi, on peut supposer que les modifications réalisées par les enzymes WaaW, WaaV et WaaL dépendent du sérotype du LPS, la souche AIEC LF82 présentant un sérotype différent de celui des souches de UPEC et de APEC étudiées. Enfin, l'opéron *waaWVL* est absent chez la souche K-12 MG1655, et l'expression forcée de cet opéron chez cette souche ne suffit pas à augmenter sa capacité à former des biofilms à un niveau similaire à celui observée pour la souche AIEC LF82. D'autres facteurs semblent ainsi être requis, en plus de WaaW-WaaV-WaaL, pour la formation de biofilms.

En conclusion, cette première étude a permis pour la première fois de montrer que le processus d'adhésion était initiateur d'une activation de la voie de signalisation dépendante du facteur de transcription  $\sigma^E$ . Il a également pu être montré, grâce à l'utilisation de modèles expérimentaux originaux, que l'activation de cette voie de signalisation était primordiale pour la formation de biofilms et la colonisation de la muqueuse intestinale par la souche AIEC de référence LF82, et ceci via l'activation de l'expression de l'opéron *waaWVL*. Suite à cette étude, il peut être envisagé que la forte osmolarité retrouvée en conditions gastro-intestinales, mais également le processus d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales observé pour les souches AIEC, conduisent à une forte activation de la voie de signalisation  $\sigma^E$ . L'activation de cette voie de signalisation contribuerait alors, comme montré dans cette étude, au pouvoir d'adhésion et d'invasion des souches AIEC, et à leur pouvoir de colonisation de la muqueuse intestinale impliquant leur capacité à former des biofilms à la surface de la muqueuse intestinale.

Afin de compléter ce travail, des perspectives à court terme sont envisagées. Tout d'abord, l'étude de la composition et de l'organisation de la flore bactérienne associée à la muqueuse intestinale des patients atteints de maladie de Crohn a indiqué une augmentation significative de la présence de biofilm bactérien, d'environ 2 fois, chez les patients atteints de MICI comparativement aux patients contrôles (Swidsinski *et al.*, 2002). Il serait ainsi intéressant d'étudier la composition de ces biofilms bactériens associés à la muqueuse des





**Figure 44 : Mesure de la formation de biofilms par des souches non-AIEC (n=36) et des souches AIEC (n=16) isolées de muqueuse iléale.**

patients atteints de MC, et d'étudier notamment la présence de souches de *E. coli* possédant l'opéron *waaWVL* au sein de ces biofilms, ainsi que le niveau d'expression de cet opéron. Des études en cours au laboratoire ont permis de montrer que les souches AIEC présentent une capacité de formation de biofilm significativement augmentée comparativement aux souches non AIEC, confirmant ainsi les précédentes observations rapportées par Martinez-Medina et coll. (**Figure 44**) (Martinez-Medina *et al.*, 2009b).

A plus long terme, des expériences en modèle murin peuvent-être envisagées afin de confirmer l'implication de cet opéron *waaWVL* dans le pouvoir de formation de biofilm par les souches AIEC. Pour cela, le modèle de souris transgéniques CEABAC10, exprimant le facteur CEACAM6 servant de récepteur aux pili de type 1, pourrait être adopté (Carvalho *et al.*, 2009). Ce modèle permettrait tout d'abord, via un système rapporteur d'activité transcriptionnel de type  $\beta$ -galactosidase cloné au sein du génome des bactéries AIEC, de confirmer que suite à l'adhésion des bactéries AIEC aux récepteur CEACAM6, la voie de signalisation dépendante du facteur de transcription  $\sigma^E$  est activée. Ce modèle permettrait également d'élucider l'implication de la formation de biofilm bactérien impliquant les facteurs WaaW WaaV et WaaL dans la persistance bactérienne, la colonisation de la muqueuse intestinale, et la survenue des lésions iléales observées dans le modèle de souris transgénique CEABAC10 (Carvalho *et al.*, 2009).



## **II- Implication des *long polar fimbriae* dans le ciblage des plaques de Peyer par les souches AIEC**

### **Publication n°2**

Crohn disease–associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer’s patches *via* long polar fimbriae

**Chassaing B.**, Rolhion N., de Vallée A., Salim S.Y., Prorok-Hamon M., Neut C., Campbell B.J., Söderholm J.D., Hugot J.-P., Colombel J.-P., Darfeuille-Michaud A.

*Journal of Clinical Investigation*, 2011;121:966-975.



## Introduction de la publication n°2

Les plaques de Peyer, organes lymphoïdes secondaires associés à la muqueuse intestinale, possèdent un épithélium particulier présentant des cellules M. Le rôle de ces dernières est de réaliser un échantillonnage d'antigènes présent dans la lumière intestinale et de les présenter au système immunitaire. Les cellules M, ayant une forte capacité de transcytose, représentent une porte d'entrée privilégiée pour de nombreuses bactéries pathogènes, leur permettant d'accéder à la lamina propria (Kuolee and Chen, 2008; Neutra *et al.*, 1996a). Ainsi, les données cliniques et expérimentales indiquent que les cellules M de l'épithélium associé aux plaques de Peyer sont impliquées, au moins lors des phases précoces de l'infection, dans la translocation de bactéries pathogènes (Sansonetti and Phalipon, 1999).

Les lésions les plus précoces observées lors de la MC sont des ulcérations aphtoides, conséquence d'une nécrose des cellules M localisées au niveau des plaques de Peyer (Fujimura *et al.*, 1996; Gullberg and Soderholm, 2006; Morson, 1972). Ce serait suite à ces ulcérations aphtoides précoces qu'apparaîtraient des ulcérations plus profondes et étendues.

Malgré les nombreuses études rapportant une augmentation du nombre de *E. coli* associés à la muqueuse intestinale chez les patients atteints de MC (Baumgart *et al.*, 2007; Conte *et al.*, 2006; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Kotlowski *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2004; Martinez-Medina *et al.*, 2009a; Neut *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2007; Swidsinski *et al.*, 2002), l'implication des souches de *E. coli* dans l'apparition des phases précoces de la MC restent à étudier. Le but de ce travail était d'analyser la capacité des souches AIEC à cibler les plaques de Peyer, et d'identifier les facteurs bactériens impliqués dans ce processus.





# Crohn disease–associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae

Benoit Chassaing,<sup>1,2</sup> Nathalie Rolhion,<sup>1</sup> Amélie de Vallée,<sup>1</sup> Sa'ad Y. Salim,<sup>3</sup> Maelle Prorok-Hamon,<sup>4</sup> Christel Neut,<sup>5</sup> Barry J. Campbell,<sup>4</sup> Johan D. Söderholm,<sup>3</sup> Jean-Pierre Hugot,<sup>6</sup> Jean-Frédéric Colombel,<sup>5</sup> and Arlette Darfeuille-Michaud<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Clermont Université, Université Auvergne, JE2526, USC INRA 2018, Clermont-Ferrand, Auvergne, France. <sup>2</sup>Institut Universitaire de Technologie, Génie Biologique, Aubière, France. <sup>3</sup>Clinical and Experimental Medicine, Linköping University, Linköping, Sweden. <sup>4</sup>School of Clinical Sciences, University of Liverpool, Crown Street, Liverpool, United Kingdom. <sup>5</sup>INSERM U 995, Université Lille II, Hôpital Claude Huriez, Lille, France. <sup>6</sup>INSERM U 843, Université Paris Diderot, France.

**Crohn disease (CD) is a multifactorial disease in which an abnormal immune response in the gastrointestinal (GI) tract leads to chronic inflammation. The small intestine, particularly the ileum, of patients with CD is colonized by adherent-invasive *E. coli* (AIEC) – a pathogenic group of *E. coli* able to adhere to and invade intestinal epithelial cells. As the earliest inflammatory lesions are microscopic erosions of the epithelium lining the Peyer's patches (PPs), we investigated the ability of AIEC bacteria to interact with PPs and the virulence factors involved. We found that AIEC bacteria could interact with mouse and human PPs via long polar fimbriae (LPF). An LPF-negative AIEC mutant was highly impaired in its ability to interact with mouse and human PPs and to translocate across monolayers of M cells, specialized epithelial cells at the surface of PPs. The prevalence of AIEC strains harboring the *lpf* operon was markedly higher in CD patients compared with controls. In addition, increased numbers of AIEC, but not LPF-deficient AIEC, bacteria were found interacting with PPs from *Nod2*<sup>-/-</sup> mice compared with WT mice. In conclusion, we have identified LPF as a key factor for AIEC to target PPs. This could be the missing link between AIEC colonization and the presence of early lesions in the PPs of CD patients.**

## Introduction

Crohn disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are multifactorial diseases, occurring in individuals with genetic predisposition in whom an environmental or infectious trigger causes an abnormal immune response (1–3). Several lines of evidence suggest that bacteria play a role in the onset and perpetuation of IBD (4). *E. coli* bacteria have been assigned a putative role in CD. They are abnormally predominant in early and chronic ileal lesions of CD, and most *E. coli* strains isolated from the ileal mucosa of CD patients adhere to intestinal epithelial cells (IECs) (5–7). In addition to their ability to adhere, these *E. coli* bacteria are able to invade IECs and belong to a new pathogenic group of *E. coli*, designated adherent-invasive *E. coli* (AIEC) (8). Several independent studies have reported the abnormal presence of AIEC associated with ileal mucosa of CD patients (7, 9–13) owing to increased ileal expression of CEACAM6, which acts as a receptor for AIEC binding via type 1 pili to the intestinal mucosa (14, 15). The adhesion and invasion process of reference AIEC strain LF82 involves, in addition to type 1 pili, flagella, outer membrane proteins, and outer membrane vesicles (OMVs) (16–18). In particular, the LF82 invasion process occurs via the interaction between the ER-localized stress response chaperone Gp96 and the outer membrane protein OmpA expressed at the surface of OMVs, allowing OMVs to fuse with IECs (19). In addition, analysis of the genome sequence of AIEC strain LF82 revealed the presence of several known virulence genes and 4 putative pathogenic islands carrying virulence-related genes (20).

Clinical observations suggest that the sites of initial inflammation in ileal CD are the lymphoid follicles (21), since microscopic erosions are observable at the specialized follicle-associated epithelium (FAE), which lines Peyer's patches (PPs) (22). The most prominent feature of FAE is the presence of specialized membranous/microfold cells (M cells), which are optimized for antigen adherence and transport and for immunological sampling of microorganisms (23). Several microorganisms, particularly invasive bacteria, take advantage of the transcytotic characteristics of M cells to use them to cross the intestinal barrier. For example, *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* cross the intestinal epithelial barrier through M cells of the FAE (24), as does rabbit enteroadherent *E. coli* (25). The mechanism responsible for *Y. pseudotuberculosis* targeting M cells is essentially mediated by invasion (26). *Salmonella* Typhimurium bacteria selectively interact ex vivo with PPs (27), and a recent study reported that glycoprotein 2 (GP2), specifically expressed on the apical plasma membrane of M cells among enterocytes (28), is recognized by FimH, the adhesin of type 1 pili on bacteria (29). These observations demonstrate that the entry of type 1 piliated bacteria, such as *E. coli* and *Salmonella* Typhimurium, into M cells could occur by means of the GP2-FimH recognition. In addition, the long polar fimbriae (LPF), encoded by the *lpf* operon, were equally responsible for *Salmonella* Typhimurium specific adherence to M cells of the murine FAE (30). In the case of *Shigella flexneri*, bacteria entry occurs essentially through the M cell monolayer of the FAE, as shown in a rabbit ligated intestinal loop assay of infection, with the involvement of IpaB and IpaC effectors (31).

As the earliest observable lesions of CD are microscopic erosions of the FAE lining the PPs and as AIEC bacteria colonize the ileal mucosa of CD patients, we aimed in the present study to

**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Citation for this article:** *J Clin Invest.* 2011;121(3):966–975. doi:10.1172/JCI44632.







search for the presence of virulence factors in AIEC that could be involved in the targeting of PPs by these invasive bacteria. We report here, in addition of the involvement of type 1 pili, the presence of a functional *lpf* operon, encoding LPF in AIEC, that allows AIEC bacteria to interact with murine and human PPs and to translocate across M cells.

## Results

**Analysis of the AIEC bacteria interaction with PPs.** With the aim of identifying AIEC bacterial factors putatively involved in the targeting of PPs, we studied the interaction between AIEC LF82 bacteria and isolated PPs in Ussing chambers. As *E. coli* bacteria were previously reported to interact with PPs via the recognition of GP2 specifically expressed on apical plasma membrane of M cells by type 1 pili (28, 29), we studied the interaction of LF82 bacteria with murine PPs in the presence of antibodies raised against GP2. The addition of anti-GP2 antibodies during AIEC LF82 infection statistically decreased the number of LF82 bacteria interacting with PPs, from  $31.89 \times 10^6 \pm 8.73 \times 10^6$  CFU in the absence of antibodies to  $6.75 \times 10^6 \pm 2.38 \times 10^6$  CFU in the presence of anti-GP2 (Figure 1A). Immunostaining experiments using anti-GP2 antibodies to visualize M cells and anti-O83 antibodies to visualize LF82 bacteria confirmed that numerous LF82 wild-type bacteria colocalized with GP2 (Figure 1B). We also observed decreased numbers of AIEC bacteria interacting with murine PPs for the type 1 pili-negative mutant LF82- $\Delta$ *fimA*. However, we still observed type 1 pili-negative LF82 mutant associated with GP2-positive cells. In addition, we also still observed LF82 bacteria interacting with PPs when 0.5% methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside was added in order to block the binding of type 1 pili to GP2. Together these results indicated that LF82 should express additional factor(s) targeting PPs in a mannose-independent manner.

**Identification of *lpf* operon in CD-associated *E. coli* strains.** We analyzed the genome sequence of AIEC strain LF82 (Genoscope, ColiScope Project, NC\_011993 890) with the aim of identifying AIEC putative virulence factors involved in PP targeting other than type 1 pili expressed in the entire family of Enterobacteriaceae and by about 60% of fecal isolates (32). This screening indicated the presence of a putative functional *lpf* operon encoding LPF (Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI44632DS1).

**The AIEC LF82- $\Delta$ *lpfA* mutant was impaired in its ability to interact with murine and human isolated PPs.** To identify the involvement of LPF in the ability of AIEC strain LF82 to target PPs, we generated the LF82- $\Delta$ *lpfA* isogenic mutant. After 3 hours infection of murine PPs in the presence of 0.5% methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside to better assess the role of LPF, a significant ( $P < 0.01$ ), 6.7-fold decrease in the number of associated AIEC LF82 bacteria was observed for the LF82- $\Delta$ *lpfA* isogenic mutant compared with wild-type AIEC strain LF82 (Figure 1C). This was not due to differences in bacterial growth, since growth curves for the wild-type strain LF82 and the LF82- $\Delta$ *lpfA* mutant were similar (Supplemental Figure 2). Nor was this due to lack of expression of type 1 pili, since the LPF-negative mutant still expressed these pili at a level similar to that in LF82 wild-type bacteria (Supplemental Figure 3). The transcomplementation of the mutant with the cloned *lpf* operon restored the interaction with murine PPs. FISH experiments using probe EUB338 to visualize bacteria indicated numerous bacteria inside PPs for the wild-type strain LF82 (Figure 1D), and very few PP-associated bacteria for the LF82- $\Delta$ *lpfA* mutant. The number of PP-associated bacteria was fully restored when the LF82- $\Delta$ *lpfA* mutant was transcomplemented

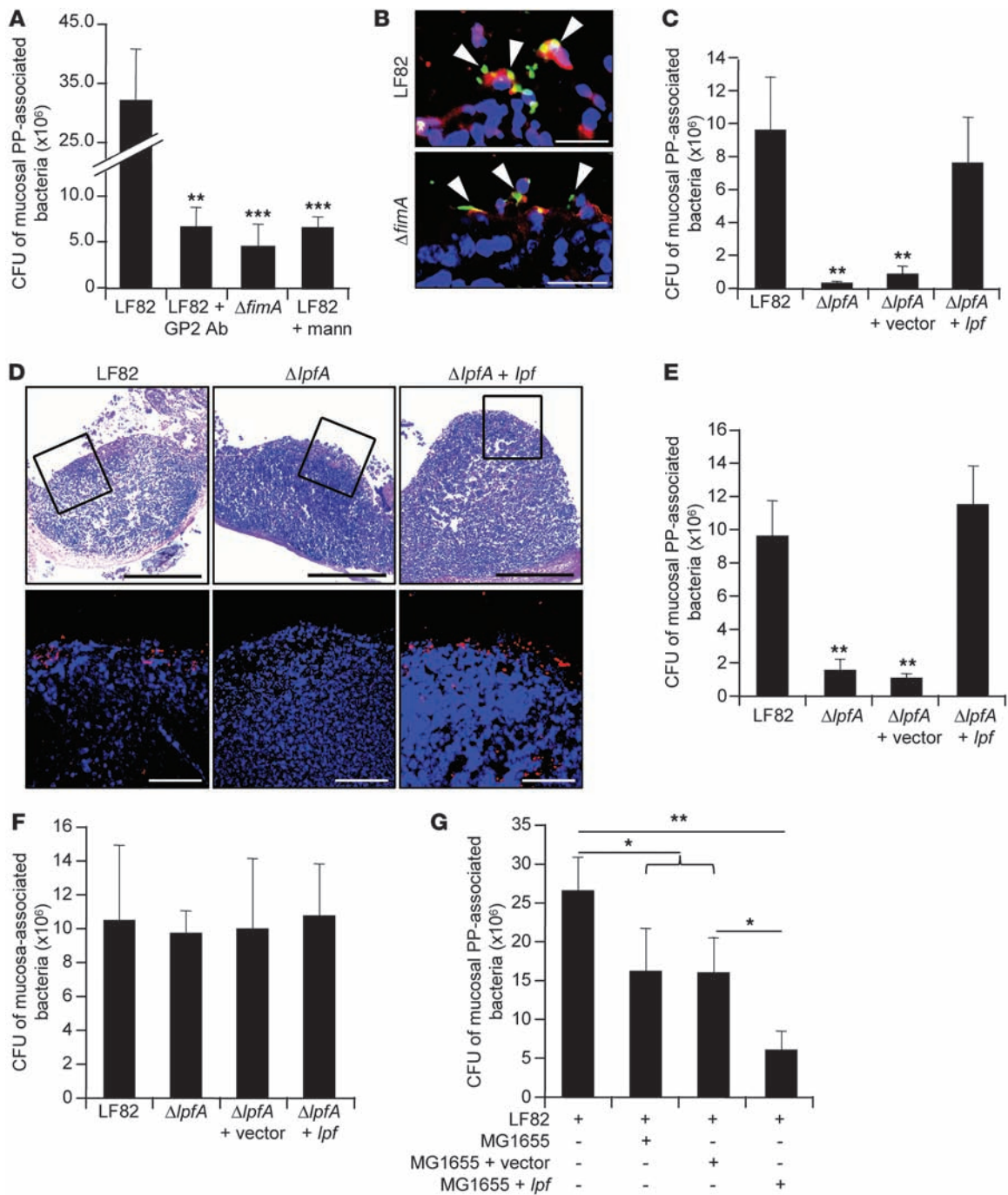
with cloned *lpf* operon, indicating that LPF are essential for AIEC LF82 bacteria to interact with murine PPs. To confirm these ex vivo data with murine intestinal tissues, we performed in vivo experiments using mouse ileal loop containing one PP. We observed a significant ( $P < 0.01$ ), 6.5-fold decrease in the number of PP-associated bacteria for the LF82- $\Delta$ *lpfA* isogenic mutant compared with wild-type AIEC strain LF82, and the wild-type phenotype was fully restored for the LPF-negative mutant expressing cloned LPF (Figure 1E). To identify whether LPF also mediate AIEC adhesion to IECs, we performed additional experiments in Ussing chambers using small intestine without PPs. Results interestingly showed that the ability of the LF82- $\Delta$ *lpfA* isogenic mutant to adhere to intestinal epithelium was similar to that of the wild-type strain LF82 (Figure 1F). Thus, this indicated that the difference in the ability of LF82 bacteria and LPF-negative mutant to bind PPs was related to a specific adhesion of LPF to FAE. In addition, the interaction of bacteria with PPs was studied in competition experiments between LF82 and nonpathogenic *E. coli* MG1655 expressing or not expressing LPF. A slight, 1.6-fold-decreased adhesion of LF82 to PPs was observed during coinfection with the nonpathogenic MG1655 *E. coli* strain, probably due to competition of type 1 pili binding to the glycoprotein GP2; and a 4.5-fold-decreased LF82 adhesion to PPs was observed during coinfection with MG1655 strain expressing LPF, confirming that the adhesion of LF82 bacteria to PPs is related to the presence of LPF (Figure 1G).

To analyze the involvement of LPF expressed by AIEC bacteria to target PPs in humans, we performed similar experiments using human isolated PPs. Confocal microscopy analyzing the uptake of bacteria across the FAE and into the subepithelial dome (SED) of human PPs using Ussing chamber indicated that, compared with wild-type strain LF82, LF82- $\Delta$ *lpfA* mutant showed 4.9-fold-decreased transepithelial uptake ( $P < 0.01$  vs. LF82) (Figure 2, A and B). Transcomplementation of the mutant with the cloned *lpf* operon restored its ability to interact with human PPs, indicating that LPF are also essential for AIEC LF82 bacteria to interact with human PPs.

**The AIEC LF82- $\Delta$ *lpfA* isogenic mutant was impaired in its ability to translocate across M-like cell monolayer and to interact with murine M cells in vivo.** We used the in vitro model of the specialized M cells, in which polarized enterocyte-like Caco-2-cl1 cells were cocultured with the Raji B cell line (33). To analyze whether these M-like cells express only a few developed microvilli as previously described (34), we performed F-actin phalloidin-TRITC labeling, and results were consistent with the presence of cells displaying morphological characteristics of M cells (Supplemental Figure 4A).

We investigated the interaction of AIEC strain LF82 with Caco-2-cl1 monocultures compared with M-like cells in the presence of 0.5% methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside. Confocal analysis showed numerous AIEC LF82 bacteria interacting with the monolayer of M-like cells compared with the Caco-2-cl1 monolayer (Figure 3, A and B). This was also observed in the absence of methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside and related to an absence of CEACAM6 expression by Caco-2-cl1 monolayers (Supplemental Figure 4B). Analysis of translocation across these monolayers indicated that only low numbers of LF82 bacteria translocated across Caco-2-cl1 monolayers even after 4 hours of infection, whereas high numbers of LF82 bacteria translocated across M cell monolayers (Figure 3D). As transepithelial electrical resistance (TEER) stayed constant during the 4 hours of infection (data not shown), this indicated that the large increase in the number of translocated bacteria was not the result of a loss of monolayer integrity.

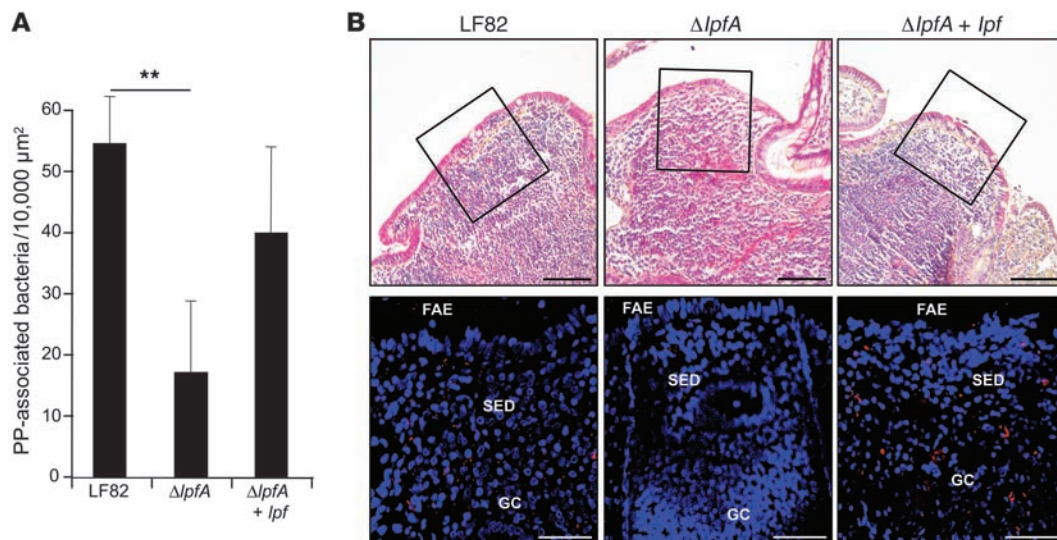




**Figure 1**

Interaction of AIEC bacteria with PPs. **(A)** Interaction of bacteria with murine PPs placed in Ussing chambers after a 4-hour infection period, with or without anti-GP2 antibody (1 μg/ml) and with or without 0.5% methyl α-D-mannopyranoside (mann). When needed, PPs were preincubated with anti-GP2 antibody. **(B)** Confocal analysis of PP sections after labeling of AIEC LF82 with LPS O83 antibody (green), of M cells with anti-GP2 antibody (red), and DNA with Hoechst (blue). Scale bars: 20 μm. Arrowheads show clear colocalization of bacteria and M cells. **(C)** Interaction of wild-type LF82 and *lpf* mutant with murine PPs placed in Ussing chambers after a 4-hour infection period. **(D)** HES staining and confocal analysis of indicated areas after Cy3-EUB228 FISH staining to detect bacteria (red) and Hoechst to identify DNA (blue). Scale bars: 100 μm for HES staining and 20 μm for confocal analysis. Images in the bottom row correspond to the boxed regions in the top row. **(E)** In vivo interaction of wild-type LF82 and *lpf* mutant with murine PPs using ileal loop assay after a 4-hour infection period in the presence of 0.5% methyl α-D-mannopyranoside. **(F)** Interaction of wild-type LF82 and *lpf* mutant with murine small intestine mucosa without PPs after a 4-hour infection period in Ussing chambers. All results are expressed as numbers of mucosa-associated bacteria; each value is the mean ± SEM of at least 5 separate experiments. **(G)** Interaction of wild-type LF82 bacteria with murine PPs placed in Ussing chambers and cocultured with nonpathogenic MG1655 *E. coli* K-12 strain expressing or not expressing LPF<sub>LF82</sub>. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.



**Figure 2**

Involvement of LPF to promote interaction between AIEC LF82 bacteria and PPs. **(A)** Quantification of intra-human PP-associated bacteria by confocal microscopy. Each value is the mean  $\pm$  SEM of 2–4 separate experiments, with 3–5 sections studied for each experiment.  $**P < 0.01$ . **(B)** Representative confocal photomicrographs of uptake of bacteria across human FAE. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$  for HES staining and 50  $\mu\text{m}$  for confocal analysis. Images in the bottom row correspond to the boxed regions in the top row. See the Figure 1D legend for staining.

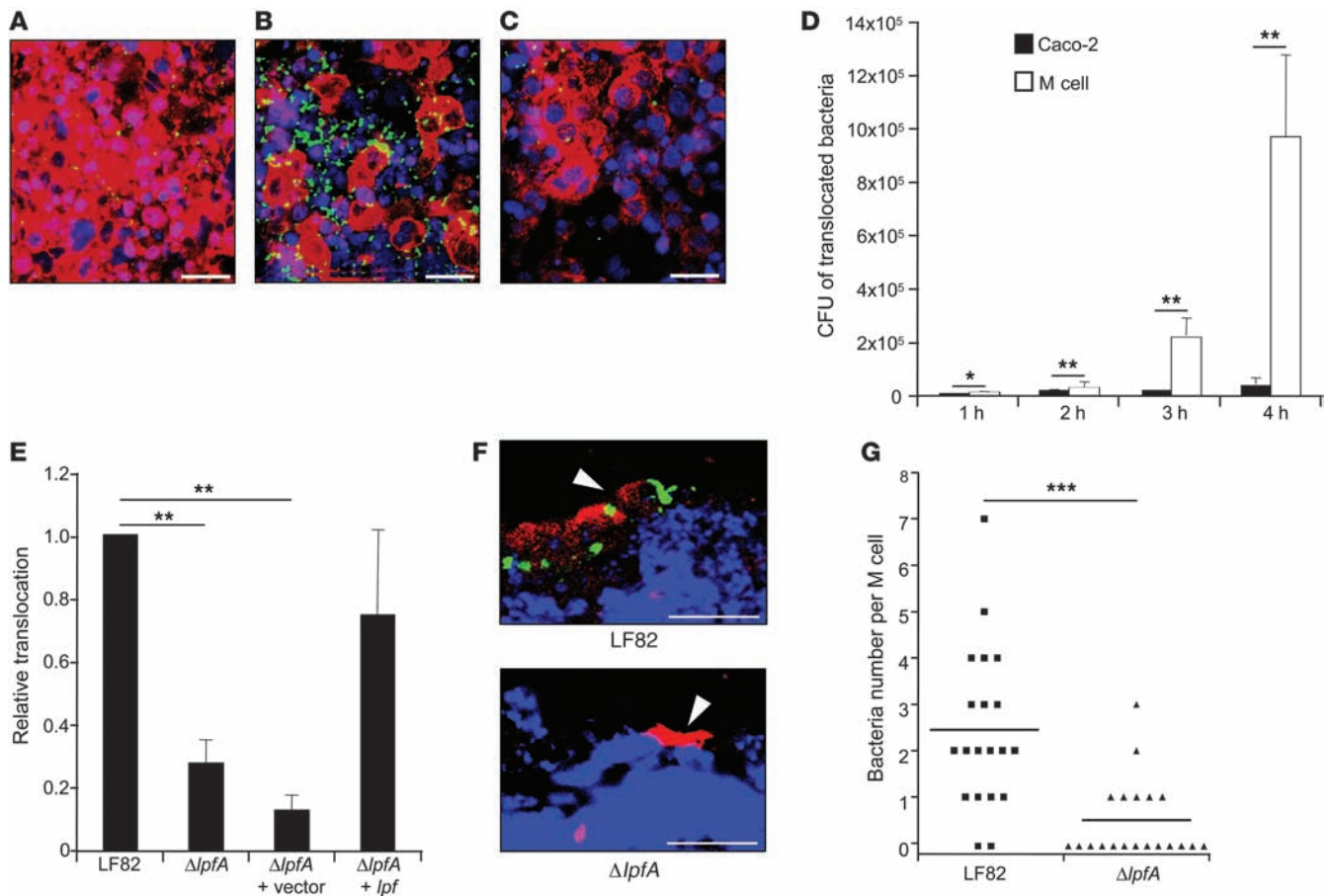
Decreased interaction of the LF82- $\Delta\text{lpfA}$  mutant compared with the wild-type strain was observed with M-like cells (Figure 3, B and C), and after 4 hours of infection, significantly decreased translocation was observed for the LF82- $\Delta\text{lpfA}$  mutant compared with the wild-type strain (Figure 3E). Transcomplementation of LF82- $\Delta\text{lpfA}$  mutant with cloned *lpf* fully restored the phenotype, indicating that LPF play a key role in targeting M cells. The observation that LPF expression is crucial for AIEC interaction with M cells was confirmed ex vivo using PPs isolated from mice and confocal analysis to search for colocalization of bacteria with M cells stained with TRITC-labeled *Ulex europaeus* agglutinin 1 at the surface of whole PPs. Results showed that the number of bacteria associated with M cells was significantly higher ( $P < 0.001$ ) for wild-type strain LF82 than for the LF82- $\Delta\text{lpfA}$  mutant (Figure 3, F and G).

*Prevalence of lpf-positive adherent-invasive E. coli strains in CD patients and controls.* Various *lpf* operons are observed among bacteria belonging to the Enterobacteriaceae family, including *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter rodentium*, enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), and rabbit enteropathogenic *E. coli* (REPEC). BLAST analysis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) indicated that LpfA protein from AIEC strain LF82 (CU651637) was most closely similar to that of *Salmonella* Typhimurium strain LT2 (NC\_003197), with 86% similarity, and to that of EHEC strain EDL-933 encoded by *lpf1* (NC\_002655), with 82% similarity (Supplemental Figure 1 and Supplemental Figure 5A). DNA sequencing of the LpfA-encoding genes of all the CD-associated *E. coli* strains positive in hybridization showed that, among ileal-associated *E. coli* strains isolated from 55 CD patients, none harbored the *lpfA* gene of *Salmonella* Typhimurium. *lpfA*<sub>LF82</sub>-positive *E. coli* strains were found in 8 (14.5%) patients, and *lpfA*<sub>Shigella</sub>-positive *E. coli* strains were found in 23 (41.8%) patients (Supplemental Figure 5). We only observed *E. coli* strains positive for *lpfA*<sub>EHEC</sub> or *lpfA*<sub>2EHEC</sub> in 4 patients, in 2 of whom the *E. coli* strains associated with the ileal mucosa also harbored the *lpfA*<sub>Shigella</sub> gene.

As a high prevalence of putatively functional *lpfA*<sub>Shigella</sub>-positive AIEC strains was observed in CD patients, we compared LPF<sub>Shigella</sub> and LPF<sub>LF82</sub> in their ability to mediate bacterial interaction with PPs. Thus, experiments were performed with CD-associated AIEC strain LF110 harboring an *lpfA* gene similar to that of *S. flexneri* 2a strain 301 (with 99% similarity, Supplemental Figure 5B) and the corresponding *lpfA*-negative mutant. The comparison of the ability of AIEC strain LF110 and strain LF82 to interact with murine PPs revealed similar numbers of PP-associated bacteria for the two AIEC strains (Figure 4). Like the LF82- $\Delta\text{lpfA}$  mutant, the LF110- $\Delta\text{lpfA}$  mutant showed a significantly decreased ability to interact with murine PPs compared with the wild-type strain. Therefore, the analysis of the presence of any *lpf* operon in ileal-associated *E. coli* strains indicated a statistically significant difference ( $P = 0.006$ ) in the prevalence of *lpfA*-positive *E. coli* strains associated with ileal specimens between CD patients and controls (Table 1). Of the 55 CD patients, 26 (47.3%) harbored *lpfA*-positive *E. coli* strains, in contrast to only 5 (17.2%) of the 29 controls without IBD. When we analyzed the presence of the *lpfA* gene in AIEC and non-AIEC strains, we observed that 12 CD patients harbored *lpfA*-positive AIEC strains. Fourteen CD patients harbored *lpfA*-positive *E. coli* strains that were not initially classified as AIEC on the basis of the expression of AIEC-specific virulence properties. Even without considering a possible underestimation of the AIEC phenotype, the prevalence of subjects harboring *lpf*-positive AIEC strains was significantly ( $P = 0.027$ ) higher in CD patients than in controls (21.8% versus 3.5%). Of note, most of the *E. coli* strains associated with the ileal mucosa of controls were non-AIEC and did not harbor the *lpfA* gene, which was highly significant compared with CD patients ( $P = 0.00006$ ).

*LPF-dependent increased interaction of AIEC LF82 bacteria with Nod2<sup>-/-</sup> PPs.* Confocal quantification of M cells on PPs using TRITC-labeled UEA1 indicated a 2.9-fold-higher number in *Nod2*<sup>-/-</sup> mice





**Figure 3** LPF are involved in the ability of AIEC strain LF82 to target M cells. Interaction of AIEC bacteria LF82 (A and B) and LF82- $\Delta lpfA$  isogenic mutant (C) with Caco-2-cl1 (A) or M-like cell (B and C) monolayers in the presence of 0.5% methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside. Phalloidin-TRITC labeling of F-actin (red), anti-O83 antibody labeling of LF82 bacteria (green), and Hoechst labeling of DNA (blue) were used. Confocal photomicrographs of interaction of bacteria with in vitro M cells are representative of 3 separate experiments. Scale bars: 25  $\mu$ m. (D) Translocation across Caco-2-cl1 or M-like cell monolayers. Results are expressed as CFU of translocated bacteria. Each value is the mean  $\pm$  SEM of at least 5 separate experiments. (E) Translocation of LF82 bacteria and LF82- $\Delta lpfA$  isogenic mutant across M-like cell monolayers after 4 hours infection. Results are expressed as translocated bacteria relative to those obtained for strain LF82, taken as 1. (F) Confocal analysis of murine PP sections after labeling of AIEC LF82 with LPS O83 antibody (green), of M cell with UEA-1 TRITC (red), and DNA with Hoechst (blue). Scale bars: 20  $\mu$ m. Arrowheads indicate UEA-1-positive cells. (G) Quantification of murine M cell-associated bacteria by confocal microscopy analysis. Bars represent the mean. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

compared with wild-type mice (Figure 5, A–C), confirming previous findings by Barreau et al. (35). In addition, quantification of GP2-positive cells using anti-GP2 antibody indicated a 2.8-fold-higher number of GP2-positive cells in *Nod2*<sup>-/-</sup> mice compared with wild-type mice (Figure 5, D–F). As GP2 expression is restricted to M cells in FAE (29), this confirmed an increased number of M cells in PPs of *Nod2*<sup>-/-</sup> mice compared with wild-type mice.

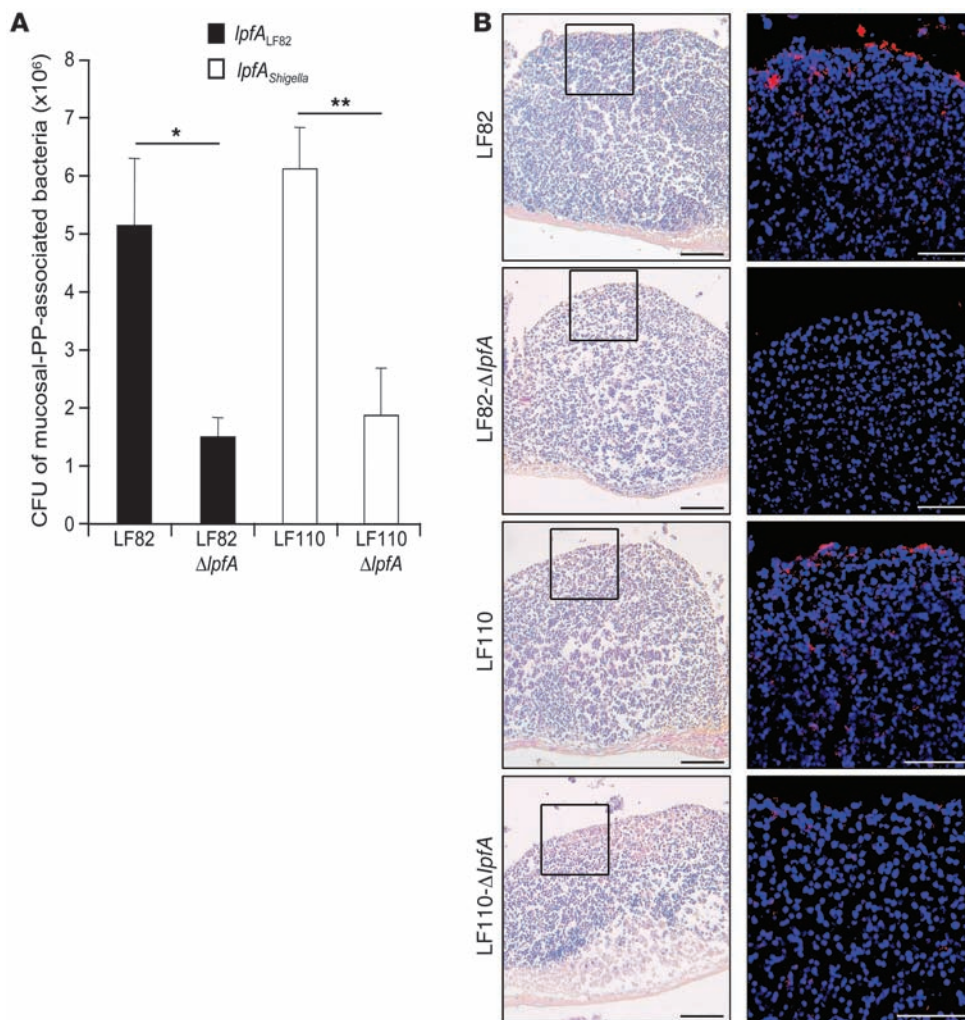
We investigated the ability of AIEC LF82 bacteria and LF82- $\Delta lpfA$  mutant to interact with murine PPs isolated from wild-type and *Nod2*<sup>-/-</sup> mice. Results presented in Figure 5G show that the number of PP-associated LF82 bacteria was significantly higher for PPs from *Nod2*<sup>-/-</sup> mice than from wild-type mice ( $P < 0.05$ ). In contrast, the number of LPF-negative LF82 mutant interacting with PPs was similar regardless of the *Nod2* genotype, indicating that the increased number of LF82 bacteria observed with PPs from *Nod2*<sup>-/-</sup> mice was linked to the expression of LPF.

## Discussion

Clinical observations suggest that the sites of initial inflammation in ileal CD are the lymphoid follicles (21, 22). A correlation exists between peak of CD case frequency (between 15 and 25 years old) and peak representing the number of PPs according to age, suggesting that CD develops as an inflammatory process specifically targeting these important lymphoid structures (36). Moreover, recent studies reported a defect in the intestinal barrier to control bacterial translocation across PPs of CD (37, 38). It is well documented that several enteroinvasive pathogens, such as *Yersinia*, *Shigella*, and *Salmonella*, invade the intestinal mucosa via the M cells of the FAE (24, 27, 31). The molecular mechanism of the specific interaction between the invasive pathogens and M cells involve the Inv invasins for *Yersinia* (26), the IpaB and IpaC effectors for *Shigella* (31), and LPF for *Salmonella* (30). It is also known that enteropathogenic *E. coli* (EPEC)







**Figure 4**  
 Comparison of ability of LPF<sub>Shigella</sub> and LPF<sub>LF82</sub> bacteria to interact with murine PPs. **(A)** Quantification of murine PP-associated bacteria for AIEC strains LF82 and LF110 and corresponding  $\Delta lpfA$  mutants. See the legend to Figure 1C. Each value is the mean  $\pm$  SEM of at least 5 separate experiments. **(B)** Visualization of bacteria interacting with murine isolated PPs. Scale bars: 100  $\mu$ m for HES staining and 50  $\mu$ m for confocal analysis. Images in the right column correspond to the boxed regions in the left row. See the legend to Figure 1D. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

are able to translocate across an in vitro M cell model and that this translocation is regulated by the type III secretion system, but the bacterial effector involved is not yet known (34).

Here we show that AIEC bacteria are able to interact with PPs involving at least one virulence factor in addition to type 1 pili. The analysis of the genome sequence of AIEC reference strain LF82 indicates the presence of an *lpf* operon encoding LPF. Such *lpf* operons were reported in *Salmonella* Typhimurium, *Shigella boydii*, and *S. flexneri* and in EHEC EDL933 (30, 39), but this is the first report to our knowledge of the presence of an *lpf* operon in CD-associated AIEC bacteria. In *Salmonella* Typhimurium, LPF promote bacterial interaction to murine PPs (30), and ex vivo assays performed with

a murine intestinal organ culture model showed that their interaction with PPs leads to full expression of LPF (40). No role has been yet reported for LPF in *Shigella*. For EHEC, experiments in pigs and sheep with O157:H7 strain 86-24 indicated that LPF contribute to intestinal colonization (41). To study the involvement of LPF in AIEC LF82 interaction with PPs, we performed in vitro experiments with M cells, and ex vivo assays with murine and human PPs. We observed that LPF have a crucial and type 1 pili-independent role in mediating the interaction between AIEC LF82 bacteria and PPs. Numerous AIEC LF82 bacteria were observed within PPs, as shown by ex vivo assays using murine and human PPs for wild-type strain, but not for the LPF-negative LF82 mutant.

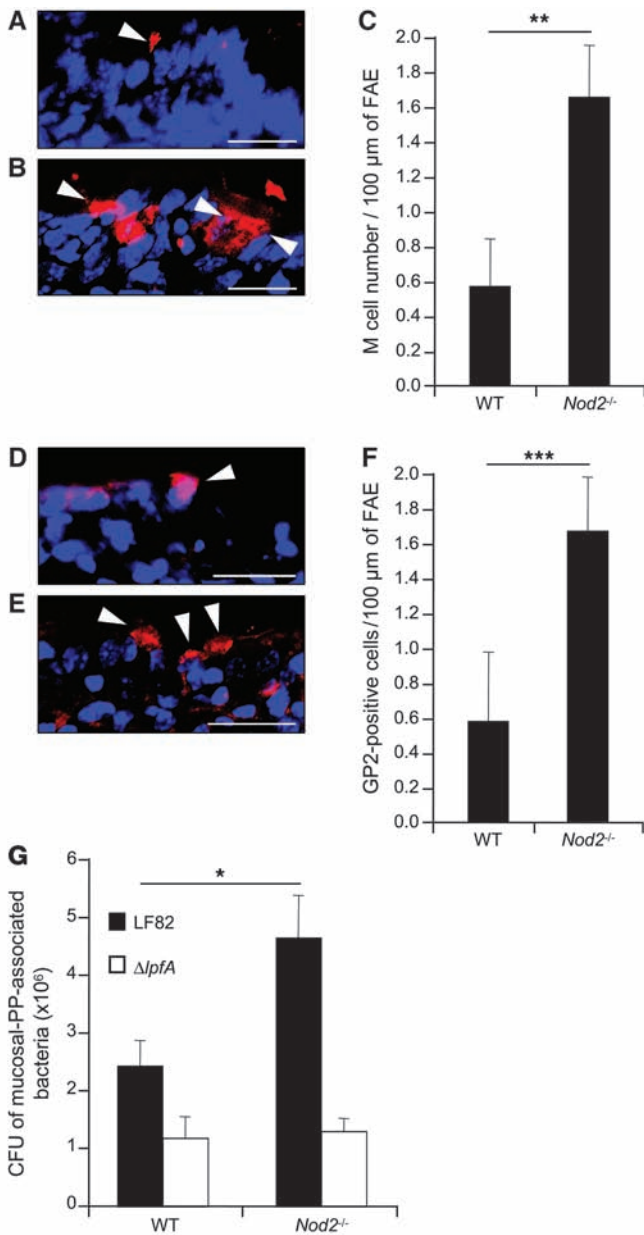
**Table 1**

Prevalence of adherent-invasive *E. coli* positive for *lpfA* gene in ileal specimens from CD patients and controls

Origin of the strains	Total no. of subjects	Total no. of subjects harboring <i>lpfA</i> -positive <i>E. coli</i> (%)	No. of subjects (%)			
			AIEC+ <i>lpfA</i> <sup>+</sup>	AIEC+ <i>lpfA</i> <sup>-</sup>	Non-AIEC <i>lpfA</i> <sup>+</sup>	Non-AIEC <i>lpfA</i> <sup>-</sup>
Ileal CD patients	55	26 (47.3)	12 (21.8)	6 (10.9)	14 (25.4)	22 (40.0)
Ileal controls	29	5 (17.2) <sup>A</sup>	1 (3.5) <sup>B</sup>	0 (0.0) <sup>C</sup>	4 (13.8) <sup>C</sup>	24 (82.7) <sup>D</sup>

*P* values for controls versus CD patients: <sup>A</sup> $P = 0.006$ ; <sup>B</sup> $P = 0.027$ ; <sup>C</sup> $P > 0.05$ ; <sup>D</sup> $P = 0.0002$ .





**Figure 5**

LPF-dependent increased interaction of AIEC LF82 bacteria with *Nod2*<sup>-/-</sup> PPs. Visualization (A, B, D, and E) and quantification (C and F) of UEA-1 TRITC-stained M cells (red) (A–C) and GP2-positive cells (red) (D–F) present in FAE of wild-type (A and D) and *Nod2*<sup>-/-</sup> (B and E) mice after cryostat section. Scale bars: 20 μm. Arrowheads indicate UEA-1- or GP2-positive cells. In C and F, results are expressed as number of M cells present in 100 μm of FAE. Each value is the mean ± SEM of 6 separate experiments, with 5–6 sections studied for each experiment. (G) Ability of wild-type LF82 bacteria and LPF-negative mutant to interact with murine PPs from wild-type and *Nod2*<sup>-/-</sup> mice. See the legend to Figure 1C. Each value is the mean ± SEM of at least 5 separate experiments. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

macrophage (42, 43). Thus, the expression of LPF in AIEC bacteria is not deleterious for these invasive bacteria crossing the FAE.

Mutations in the *CARD15/NOD2* gene are associated with abnormal development and function of PPs, since *Nod2*-knock-out mice exhibit an increased number of PPs also characterized by an excess of M cells and CD4<sup>+</sup> T cells (35). In the present study, probably owing to the increased numbers of M cells, we observed LPF-dependent increases in numbers of AIEC LF82 bacteria interacting with PPs from *Nod2*<sup>-/-</sup> compared with WT mice. Interestingly, AIEC bacteria are more frequently isolated during early recurrence of ileal CD (9), and *Nod2* mutations are mostly associated with ileal involvement, structuring complications, and a slightly earlier age of onset (44). In this context, the analysis of a large cohort of CD patients is necessary to search for a possible correlation between *NOD2* polymorphisms and the presence of adherent-invasive *E. coli* expressing LPF. Of note, *NOD2*-deficient mice do not develop macroscopically or clinically evident colitis in response to their own microbiota or when challenged with AIEC bacteria (N. Barnich, unpublished observations), indicating that some other genetic or environmental factors are required to create the necessary conditions for increasing host susceptibility to invasion by LPF-expressing bacteria. Perhaps the generation of humanized transgenic mice expressing CEACAM6 in the small bowel using a villin promoter and knockout for *Nod2* could indicate whether ileal bacterial colonization involving abnormal CEACAM6 expression is a missing host susceptibility factor.

Two major *lpf* operons were identified in CD-associated *E. coli* strains, similar to those found in strain LF82 and *Shigella*. Interestingly, we show here that the roles of the LPF<sub>*Shigella*</sub> and LPF<sub>LF82</sub> in their ability to interact with PPs are similar, and that there was a statistically significant increase in the prevalence of *lpfA*-positive *E. coli* strains, whatever the *lpfA* origin, in ileal specimens from CD patients compared with controls. We therefore suggest that *lpfA* probes are very useful and sensitive molecular tools for investigating the presence of fully pathogenic AIEC in CD patients, since we observed some *lpfA*-positive CD-associated *E. coli* strains that were not initially classified as AIEC on the basis of all AIEC-specific virulence properties.

In conclusion, our findings, in addition to the suspected major role of PPs in CD as observed by histological and functional examination of the gut mucosa, show that CD-associated AIEC bacteria by expressing LPF can use PPs as an open gate to induce early stages of the disease. This observation could be very relevant, since there is a potential role of gastrointestinal infections in the onset of IBD as reported by two studies, including a recent

M cells can serve as an entry portal for many enteroinvasive pathogens. We observed here that AIEC LF82 bacteria translocated at a very high level through M cell monolayers, but not as the result of the loss of monolayer integrity, since we observed that the TEER of M cell monolayers was not modified after infection with strain LF82. A decreased ability to translocate was observed for the LPF-negative mutant, and confocal analysis showed that AIEC LF82 bacteria interacted with M cells at the surface of murine PPs only when LPF were expressed. Together, these experiments demonstrate a functional role for the LPF of AIEC strain LF82 in targeting M cells on the surface of PPs. Of note, the enteric pathogens crossing the FAE need to survive phagocytosis and bacterial killing by resident and recruited macrophages in the dome of the lymphoid follicle. This is not really a problem for AIEC bacteria, since one of the characteristics of AIEC is their ability to survive and replicate at a high rate in phagolysosomes within





Danish population-based cohort long-term follow-up study that showed that gastroenteritis caused by nontyphoid *Salmonella* or thermophilic *Campylobacter* increases the risk of developing IBD (45, 46). LPF are expressed by *Salmonella*, giving weight to the idea that PPs are major players in IBD. Further analyses are therefore needed to investigate the presence of LPF-expressing pathogens in CD tissues. In particular, such studies should address whether the Gram-negative intramucosal bacteria observed in 73% of CD patients express LPF, since 58% of these intramucosal bacteria were not identified as *E. coli* (7). Taken together, our data reinforce the idea that underlying genetic components in hosts affected by IBD might create the necessary conditions for increasing host susceptibility to invasion by LPF-expressing bacteria, which aggravates the disease. This is another example of co-evolution between pathogens and the host, as we previously reported that AIEC bacteria express type 1 pili variant to better bind to abnormally expressed CEACAM6 by ileal enterocytes of CD patients (14, 15). From the data presented here, the co-evolution could involve, on the host side, increased numbers of PPs and M cells in patients and, on the pathogen side, the presence of virulence genes encoding LPF. We previously reported that CEACAM6 expression by IECs is positively regulated by AIEC adhesion and also by proinflammatory cytokine stimulation, and so we can speculate that more bacteria will reach the FAE underlying macrophages, and that more proinflammatory cytokines will be synthesized, leading to an amplification loop of colonization and inflammation.

## Methods

**Reference bacterial strains, plasmids, and culture conditions.** The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Supplemental Table 1. Bacteria were grown routinely in LB broth or in cell culture medium (EMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum [PAA]), with 2% wt/vol bile salts (sodium cholate, Sigma-Aldrich), overnight at 37°C and without shaking.

**Construction of isogenic mutants and transcomplementation assays.** Isogenic mutants were generated with a PCR product using the method described by Datsenko et al. (47). Primers used are listed in Supplemental Table 2. For transcomplementation assays, a PCR product containing the entire 5,454-bp *lpf* operon was cloned into the pBAD24 vector (48) (Supplemental Tables 1 and 2).

**Interaction of bacteria with murine PPs using Ussing chamber and mouse ileal loop experiments.** Biopsy samples from ileum containing PPs or without PPs of 6-week-old FVB wild-type or *Nod2*<sup>-/-</sup> male mice were placed in a 0.196-cm<sup>2</sup> chamber with 1.6 ml of circulating oxygenated Ringer solution at 37°C with or without 0.5% methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside. Bacterial interactions were studied using viable bacteria at a final concentration of  $8 \times 10^7$  CFU/ml in the mucosal reservoir. Four hours after infection, biopsy samples were washed and crushed with an Ultra-Turrax in the presence of 0.1% Triton X-100, and bacteria numbers were determined by plating. When needed, anti-GP2 antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.) was added at a final concentration of 1  $\mu$ g/ml in the circulating mucosal Ringer solution during 30 minutes of preinfection and during the 4 hours of infection. For cocubation experiments,  $8 \times 10^7$  CFU/ml of LF82 strain were mixed with  $8 \times 10^7$  CFU/ml of nonpathogenic *E. coli* strain MG1655, MG1655 + pBAD24, or MG1655 + pBAD24-*lpf*. After 4 hours of infection, the number of LF82 bacteria was determined by plating on erythromycin-containing agar medium to select for AIEC LF82.

For visualization of the interaction, 3- $\mu$ m sections of paraffin-embedded PPs were stained with hematoxylin/eosin/safranin (HES) or subjected to FISH using Cy3-labeled probe EUB338 (49). To search for a colocalization between bacteria and M cells, TRITC-labeled *U. europaeus* agglutinin 1

(Sigma-Aldrich) or anti-GP2 antibody was used to label M cells and antibodies raised against *E. coli* LPS O83 were used to label LF82 bacteria. The slides were examined with a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope.

Interactions of bacteria with PPs were also studied using mouse ileal loops, as previously described (50). Briefly, mice were starved for 24 hours before operation, with water available ad libitum. Mice were anesthetized, and their intestines exteriorized through a midline incision. Two or 3 intestinal segments (about 1 cm) containing 1 PP were ligated, and  $5 \times 10^7$  CFU were injected into the loop. Four hours after injection, the animals were killed, the loops were excised, and the number of PP-associated bacteria was determined as previously described. Animal protocols were approved by the Committee for Ethical Issues, CEMEA Auvergne (Clermont-Ferrand, France).

**Interaction of bacteria with human isolated PPs.** PPs were isolated from human ileum using dissection microscopy as previously described in detail (38). PPs from CD patients were obtained from macroscopically normal ileum of 10 patients undergoing surgery for recurrence at a previous ileocolonic anastomosis (6 men, 4 women; median age, 30 years, range, 21–59; 5 on maintenance with mesalamine, 3 on azathioprine, 2 no medication). Routine histology showed no inflammation to mild inflammation in the sampled part of the ileum. PPs from controls were obtained from macro- and microscopically normal ileal specimens of patients who had undergone surgery for right-sided colon cancer. The control patients had no signs of generalized disease, and none had received preoperative chemo- or radiotherapy. The study was approved by the Regional Human Ethics Committee in Linköping, Sweden, and all subjects had given informed consent. Bacterial uptake across FAE was performed in Ussing chambers, as previously described (38). Experiments were performed in the presence of 0.5% methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside.

**Translocation across M cell monolayers.** The coculture conditions were as follows:  $5 \times 10^5$  Raji B cells were resuspended in complete DMEM (PAA) and added to the basolateral chamber of 14-day-old Caco-2-c11 cell monolayers grown on 12-mm Transwell cell culture inserts (Millipore), and the cocultures were maintained for 4–6 days (33, 51, 52). The corresponding monocultures of Caco-2-c11 cells on matched filter supports were used as controls. The integrity of cell monolayers was measured by monitoring TEER with an Millicell-ERS (Millipore).

For translocation assay, the apical surface of M cell monolayers was infected in the presence of 0.5% methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside with 10  $\mu$ l bacterial suspension containing  $1 \times 10^7$  bacteria. Basolateral medium was removed 4 hours after infection, and samples were diluted and plated onto Müller-Hinton agar plates to determine the number of CFU of translocated bacteria.

For visualization of the monolayers, Caco-2 cells cultured alone or with Raji B cells, with or without infection, were washed thoroughly in PBS and fixed in 2% paraformaldehyde at 4°C for at least 45 minutes. After permeabilization of cells with Triton X-100 (0.3% in PBS for 20 minutes), Transwells were incubated with rabbit anti-O83 antibody (1:200 in PBS) for 45 minutes at room temperature and, after washing with PBS, with FITC-conjugated anti-rabbit antibodies (1:100 in PBS). F-actin was simultaneously localized by inclusion of phalloidin-TRITC with the secondary antibody. Transwells were then washed thoroughly in PBS and mounted in Vectashield containing DAPI (Vector Laboratories). Transwells were examined with a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope.

***E. coli* strains isolated from IBD patients and controls, and DNA dot blot hybridization and sequencing.** A total of 249 *E. coli* strains were isolated from ileal specimens from 55 of 63 CD patients tested who had undergone ileocolostomy with end-to-end ileocolonic anastomosis and from ileal specimens from 29 of 36 controls with right-sided colon cancer who had undergone right hemicolectomy. None of the patients received antibiotics in the 4 weeks before sampling. All patients and controls gave informed consent, and approval from the local ethics committee (CCPPRB, Lille) was obtained. None of the controls developed IBD at follow-up evaluation.





Hybridizations were performed on extracted DNA from *E. coli* strains with PCR fragments as DNA probes corresponding to *lpfA* from AIEC strain LF82, *Salmonella* Typhimurium, *Shigella boydii*, and EHEC O157:H7 *lpfA*<sub>1</sub> and *lpfA*<sub>2</sub> (Supplemental Table 2). Single-stranded DNA was sequenced, translated, and analyzed using ExPASy (<http://expasy.org/tools/dna.html>) and EBI-ClustalW software (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) using the default options.

**Statistics.** Numerical values are expressed as means with SEM. Statistical comparisons were performed using 2-tailed Student's *t* test or Mann-Whitney *U* test when appropriate, unless the variables required a 2-tailed Fisher exact test. For experiments with multiple treatment groups, ANOVA was performed, followed by pairwise comparisons using Bonferroni's multiple comparison tests. All tests were 2 sided. A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant.

**Acknowledgments**

This study was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie (JE2526), INRA (USC-2018), and by grants from the Association F. Aupetit (AFA), the European Commission through the FP7 IBDase project, and the Swedish Research Council (VR-M 2005-7013). Studies in B.J. Campbell's laboratory were supported

by the National Institute of Health Research Specialist Biomedical Research Centre in Microbial Disease (01CD1), the Wellcome Trust UK (074949/Z/04/Z), and the National Association for Colitis and Crohn's Disease UK (M/08/1). We thank Lothar Beutin (Department of Biological Safety, Robert Koch Institut, Berlin, Germany) for anti-O83 antibodies. We also thank Pierre Sauvanet for help with tissue inclusions and sections, Adeline Sivignon for help with hybridization experiments, and Nicolas Barnich for help with Ussing chambers and animal experiments. We thank Christelle Blavignac, Claire Sczepaniak, and Lorraine Gameiro (CICS, Université Auvergne) for technical assistance with electron microscopy and the CICS platform for confocal microscopy.

Received for publication August 4, 2010, and accepted in revised form December 1, 2010.

Address correspondence to: Arlette Darfeuille-Michaud, Pathogénie Bactérienne Intestinale, CBRV, 28 place Henri Dunant, 63001 Clermont-Ferrand, France. Phone: 33.4.73.17.79.97; Fax: 33.4.73.17.83.71; E-mail: arlette.darfeuille-michaud@u-clermont1.fr.

1. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:573–621.
2. Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* 2007;117(3):514–521.
3. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2007;448(7152):427–434.
4. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2008;134(2):S77–S94.
5. Darfeuille-Michaud A, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1998;115(6):1405–1413.
6. Swidsinski A, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2002;122(1):44–54.
7. Martin HM, et al. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology.* 2004;127(1):80–93.
8. Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun.* 1999;67(9):4499–4509.
9. Darfeuille-Michaud A, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2004;127(2):412–421.
10. 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):872–882.
11. 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):403–418.
12. Sasaki M, et al. Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest.* 2007;87(10):1042–1054.
13. 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):397–409.
14. Carvalho FA, 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):2179–2189.
15. 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):1566–1574.
16. Barnich N, Boudeau J, Claret L, Darfeuille-Michaud A. Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol Microbiol.* 2003;48(3):781–794.
17. Boudeau J, Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol Microbiol.* 2001;39(5):1272–1284.
18. Rolhion N, Carvalho FA, Darfeuille-Michaud A. OmpC and the sigma(E) regulatory pathway are involved in adhesion and invasion of the Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82. *Mol Microbiol.* 2007;63(6):1684–1700.
19. Rolhion N, et al. Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive *Escherichia coli* invasion. *Gut.* 2010;59(10):1355–1362.
20. Miquel S, et al. Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS One.* 2010;5(9): pii: e12714.
21. Morson BC. The early histological lesion of Crohn's disease. *Proc R Soc Med.* 1972;65(1):71–72.
22. Gullberg E, Soderholm JD. Peyer's patches and M cells as potential sites of the inflammatory onset in Crohn's disease. *Ann NY Acad Sci.* 2006;1072:218–232.
23. Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:301–332.
24. Marra A, Isberg RR. Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of *Yersinia pseudotuberculosis* across the Peyer's patch intestinal epithelium. *Infect Immun.* 1997;65(8):3412–3421.
25. Inman LR, Cantey JR. Specific adherence of *Escherichia coli* (strain RDEC-1) to membranous (M) cells of the Peyer's patch in *Escherichia coli* diarrhea in the rabbit. *J Clin Invest.* 1983;71(1):1–8.
26. Isberg RR, Leong JM. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell.* 1990;60(5):861–871.
27. Jones BD, Ghori N, Falkow S. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med.* 1994;180(1):15–23.
28. Terahara K, et al. Comprehensive gene expression profiling of Peyer's patch M cells, villous M-like cells, and intestinal epithelial cells. *J Immunol.* 2008;180(12):7840–7846.
29. Hase K, et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature.* 2009;462(7270):226–230.
30. Baumler AJ, Tsois RM, Heffron F. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(1):279–283.
31. Sansonetti PJ, Arondel J, Cantey JR, Prevost MC, Huerre M. Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. *Infect Immun.* 1996;64(7):2752–2764.
32. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev.* 1991;4(1):80–128.
33. Kerneis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl JP, Pringault E. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science.* 1997;277(5328):949–952.
34. Martinez-Argudo I, Sands C, Jepson MA. Translocation of enteropathogenic *Escherichia coli* across an in vitro M cell model is regulated by its type III secretion system. *Cell Microbiol.* 2007;9(6):1538–1546.
35. Barreau F, et al. CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *PLoS ONE.* 2007;2(6):e523.
36. Van Kruiningen HJ, Ganley LM, Freda BJ. The role of Peyer's patches in the age-related incidence of Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol.* 1997;25(2):470–475.
37. Salim SY, et al. CD83+CCR7- dendritic cells accumulate in the subepithelial dome and internalize translocated *Escherichia coli* HB101 in the Peyer's patches of ileal Crohn's disease. *Am J Pathol.* 2009;174(1):82–90.
38. Keita AV, 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):135–144.
39. Torres AG, et al. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* 2002;70(10):5416–5427.
40. Norris TL, Kingsley RA, Bumler AJ. Expression and transcriptional control of the *Salmonella typhimurium lpf* fimbrial operon by phase variation. *Mol Microbiol.* 1998;29(1):311–320.
41. Jordan DM, Cornick N, Torres AG, Dean-Nystrom EA, Kaper JB, Moon HW. Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in vivo. *Infect Immun.* 2004;72(10):6168–6171.
42. Bringer MA, Barnich N, Glasser AL, Bardot O, Darfeuille-Michaud A. HtrA stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent and

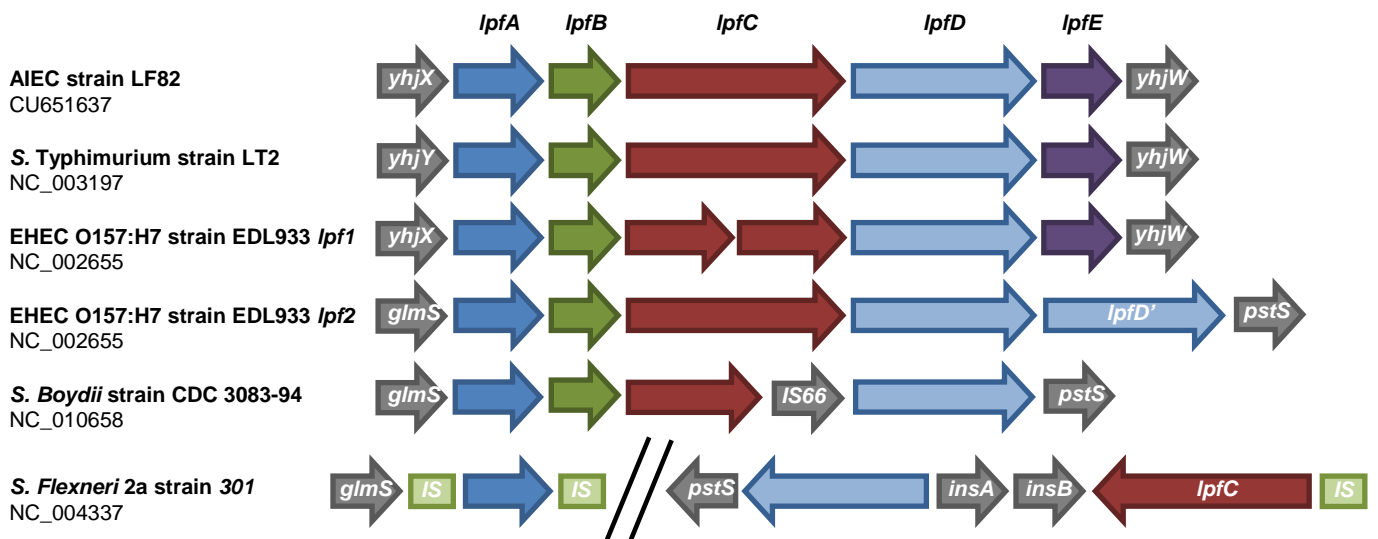






- invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Infect Immun*. 2005; 73(2):712-721.
43. Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, Perruchot MH, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun*. 2001;69(9):5529-5537.
44. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol*. 2004;99(12):2393-2404.
45. Gradel KO, Nielsen HL, Schonheyder HC, Ejlersen T, Kristensen B, Nielsen H. Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after *Salmonella* or *Campylobacter* gastroenteritis. *Gastroenterology*. 2009;137(2):495-501.
46. Porter CK, Tribble DR, Aliaga PA, Halvorson HA, Riddle MS. Infectious gastroenteritis and risk of developing inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2008;135(3):781-786.
47. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(12):6640-6645.
48. Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol*. 1995;177(14):4121-4130.
49. Hogardt M, Trebesius K, Geiger AM, Hornef M, Rosenecker J, Heesemann J. Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2000;38(2):818-825.
50. Hitotsubashi S, Fujii Y, Yamanaka H, Okamoto K. Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Infect Immun*. 1992;60(11):4468-4474.
51. Lo D, et al. Cell culture modeling of specialized tissue: identification of genes expressed specifically by follicle-associated epithelium of Peyer's patch by expression profiling of Caco-2/Raji co-cultures. *Int Immunol*. 2004;16(1):91-99.
52. Gullberg E, et al. Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M-cell model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 279(3):808-813.



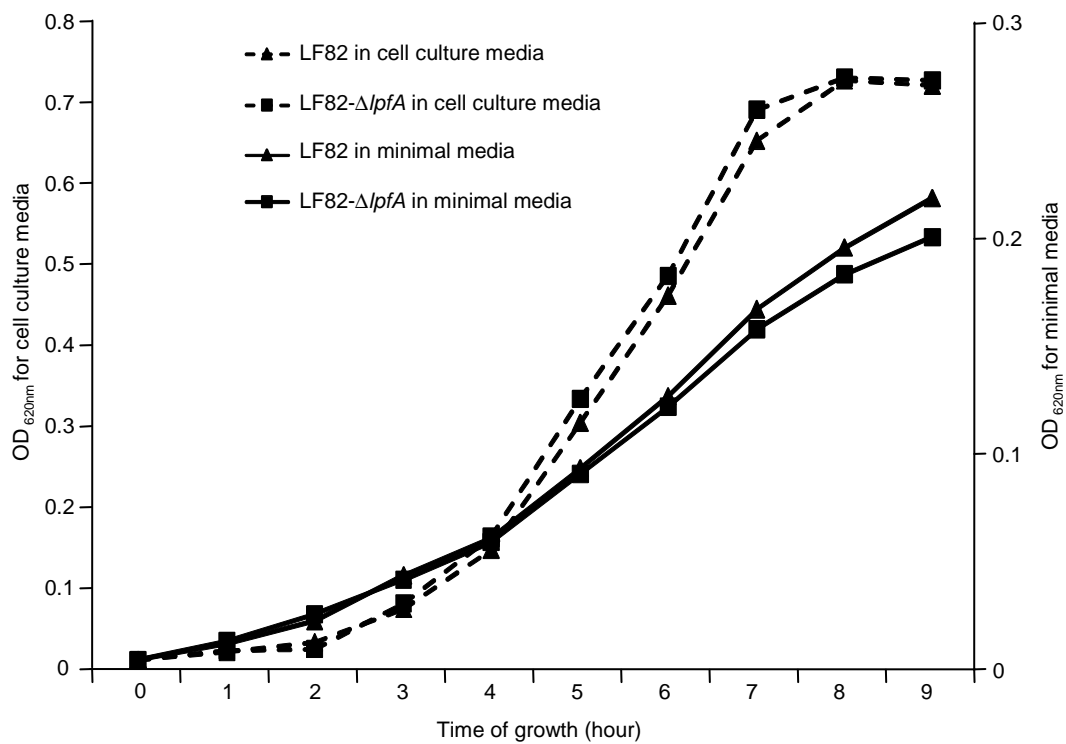


Protein	Putative fonction	Amino acids	Theoretical mass (kDa)	% identity (% similarity) to LP fimbrial operon of:				
				<i>S. Typhimurium</i>	EHEC O157:H7 <i>lpf1</i>	EHEC O157:H7 <i>lpf2</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. flexneri</i>
LpfA	Major subunit	174	18.16	69 (86)	69 (82)	34 (48)	37 (51)	37 (50)
LpfB	Chaperone	228	25.41	69 (80)	64 (78)	36 (58)	29 (56)	-
LpfC	Usher	843	92.75	73 (84)	68 (82)	40 (60)	30 (46)	39 (59)
LpfD	Minor Subunit	359	38.88	45 (61)	37 (53)	LpfD 25 (44) Lpf D'25 (42)	30 (45)	30 (47)
LpfE	Minor subunit	174	18.39	54 (75)	48 (66)	-	-	-

**Figure S1: Genetic organization of the *lpf* region of AIEC strain LF82, and comparison with *lpf* of enteric bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family.**

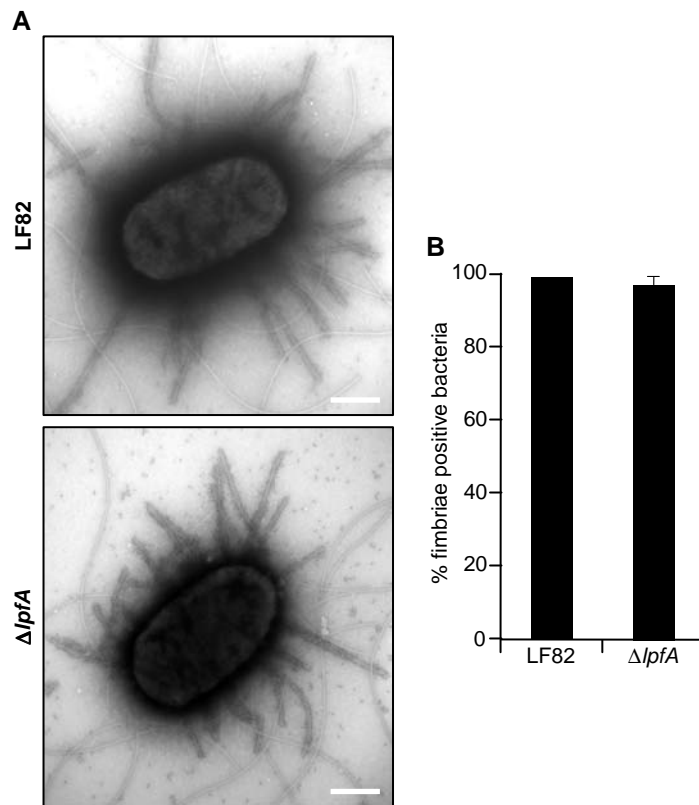
Genes are shown as arrows with patterns representing their putative function: *lpfA*: major fimbrial subunit; *lpfB*: chaperone; *lpfC*: outer membrane usher chaperone; *lpfD* and *lpfE*: minor fimbrial subunit. The proteins encoded by the AIEC LF82 *lpf* region and some of their features are listed.





**Figure S2:** Growth curves of the wild-type strain LF82 and of LF82-Δ/pfA in cell culture medium and in minimal medium M9.

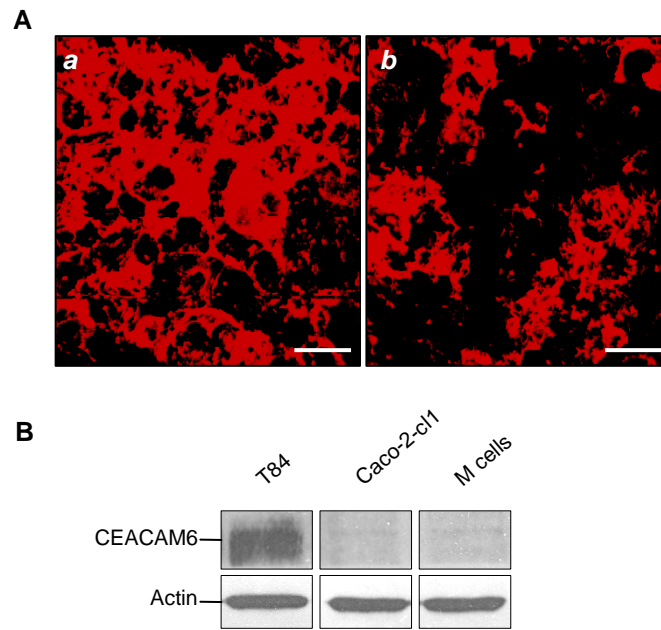




**Figure S3:** Visualization (A) and quantification (B) of fimbriated LF82 bacteria (a) and LF82- $\Delta/pfA$  mutant (b). Bacteria were grown overnight in cell culture medium at 37°C without shaking, placed for 1 min on carbon-Formvar copper grids, gold immunolabelled using polyclonal antibodies raised against purified type 1 pili, and negatively stained for 1 min with acid phosphotungstic, pH 6.0. Grids were examined with a Hitachi H-7650 transmission electron microscope. Bars, 0.5  $\mu$ m. In panel B, results are expressed as percentage of fimbriated bacteria. Each value is the mean  $\pm$  SD of three separate experiments, with approximately 100 observed bacteria.







**Figure S4: A-** Confocal microscopy analysis comparing Caco-2 (*a*) monocultures and Caco-2/Raji cocultures (*b*). Phalloidin-TRITC labelling of F-actin reveal appearance of dark cells with little apical actin following coculture. Bar, 25  $\mu$ m. **B-** Immunoblot analysis using antibodies raised against CEACAM6 (clone 9A6, Genovac, Switzerland) and actin to analyze the CEACAM6 expression by M-cells.



**A**

```

AIEC LF82 MKKVLFALSALALTSVFAADAGDGSVKFTGEIVDAACVWSPDTQKQEVVLGQVKNKSVFTTGDKSAATPFKIKLENCDISTFKNVEISFNGVGDADNSKLLISVSTPGAATGVGIGIY 120
S. Typhimurium MKKVVFALSALAVVSTSAFAAESGDGIKFTGEIVDAPCVVSTDSQNEVVLGQVKNKIFKAIGDKSSSKPFQIKLEDCDITISNTKVNVSFNGVGDIDDLVSVNTEAGAATGVGIGIY 120
EHEC O157:H7 lpf1 MKKVVFALTALALTSGITVFAAESGDGIVKFTGEIVDSPCVLSVDSQNEVVLGQVQKSVFAAVGDKSPAKPFEIKLEDCDITTMKKANVSFSGVGDABKSDLISVSTEGAARKGVGIGIY 120
****:*:*:*:*:* * :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
AIEC LF82 DNTNITLVDLNTGKSATVLKEGQTVLYFTANYVATKNAVITIGYGNAEVDFNLTYN 174
S. Typhimurium DNANKLVEMNTGKSTTTLAAGQTVLYFTANYVATKNDITVTIGYGNAEVDFNLSYE 174
EHEC O157:H7 lpf1 DNSNTLVALNGGKASVDLSKQTVLYFTANYVSTLAVTTIGYGNAQVDFNLSYE 174
**:*:*:* * * :*:* * * :*:*:*:*:*:*:* * :*:* * * :*:*:*:*:*:*:*

```

**B**

```

AIEC LF110 MKRNIIGGAFTLASLMLAGNALAEDGVVHVFVGEIVDITCEVTSDTADQIVPLGKVKSNFSGVGSLSAPQQFSIKLEKCPATYTAQAAVRFVDFGTEAPGGDGLKVGITPLTAGNPGDFTGTG 120
S. flexneri MKRNIIGGAFTLASLMLAGHALAEDGVVNFVGEIVDITCEVTSDTADQIVPLGKVKSNFSGVGSLSAPQQFSIKLEKCPATYTAQAAVRFVDFGTEAPGGDGLKVGITPLTAGNPGDFTGTG 120
*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
AIEC LF110 QAIAATGVGIRIFNQSDNSQVKLYNDSAYTAIDAEKGAEMKFIARYVATNATVTTAGTANADSQFTVEYKK 190
S. flexneri QAIAATGVGIRIFNQSDNSQVKLYNDSAYTAIDAEKGAEMKFIARYVATNATVTTAGTANADSQFTVEYKK 190
*****

```

**C**

Strain	Residue number							
	27	62	63	68	103	153	156	160
LF82	S	T	T	A	I	A	N	I
LF115	-	-	-	-	-	-	-	-
LF73	-	-	-	-	-	-	-	-
LF57	-	-	-	-	-	-	-	-
LF47	-	-	-	-	-	-	-	-
LF8	T	A	M	T	V	S	D	T
LF50	T	A	M	T	V	S	D	T
LF63	T	A	M	T	V	S	D	T

**D**

Strain	Residue number								
	13	20	29	44	49	71	78	139	151
<i>Shigella</i>	A	H	N	D	I	K	N	S	A
LF14	-	-	H	V	-	-	-	-	V
LF129	-	-	H	-	-	-	-	-	V
LF8	-	-	H	-	-	-	-	-	-
LF10	-	-	H	-	-	-	-	-	-
LF13	-	-	H	-	-	-	-	-	-
LF40	-	-	H	-	-	-	-	-	-
LF89	-	-	H	-	-	-	-	-	-
LF9	-	-	H	-	-	-	-	-	-
LF74	T	-	H	-	-	-	-	-	-
LF15	-	-	H	-	-	-	-	-	-
LF19	-	-	H	-	-	-	-	-	-
LF63	-	-	H	-	-	-	-	-	-
LF92	-	-	H	-	-	-	-	-	-
LF122	-	-	H	-	-	-	-	-	-
LF98	-	-	H	-	-	-	-	-	-
LF69	-	-	H	-	-	-	-	-	-
LF50	-	-	H	-	-	-	-	-	-
LF133	-	-	H	-	-	-	-	#	-
LF30	-	-	H	-	T	Q	K	-	-
LF106	-	-	H	-	T	Q	K	-	-
LF138	-	-	H	-	T	Q	K	-	-
LF110	-	N	H	-	-	Q	K	-	-
LF112	-	N	H	-	-	Q	K	-	-

**Figure S5: Multiple alignment of LpfA proteins from AIEC strains.** Comparison of LpfA between AIEC strain LF82, *S. Typhimurium* strain LT2, and EHEC O157:H7 strain EDL933 *lpf1* (A), and between AIEC strain LF110 and *S. flexneri* 2a strain 301 (B) with EBI-ClustalW softwares using the default options. C and D: Analyses of LpfA sequences of CD-associated *E. coli* strains. The residues listed are for the amino acids in the LF82 LpfA sequence (C) or *S. flexneri* LpfA sequence (D). Only polymorphic residues are shown. #, stop codon.



**Table S1.** Bacterial strains and plasmids used in this study

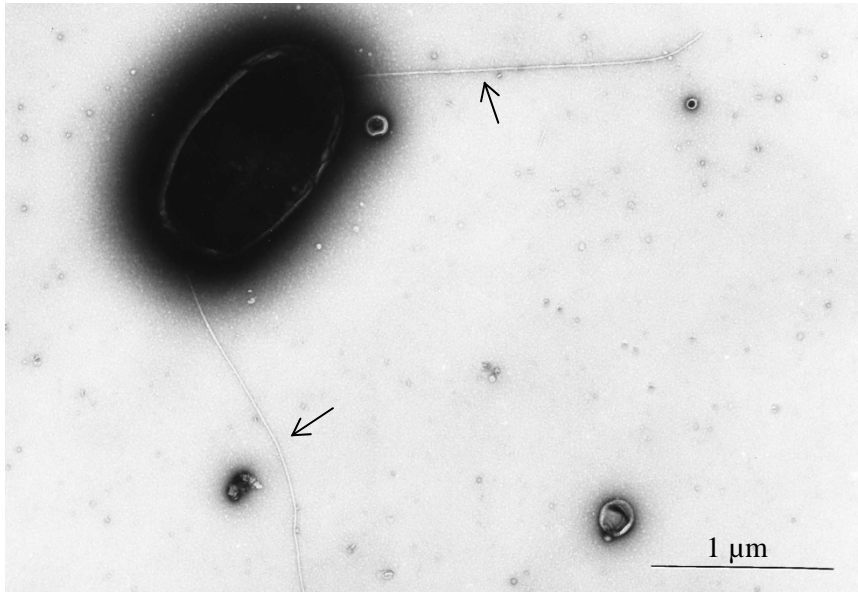
Strains or plasmids	Relevant characteristic(s)	Source or reference
<b>Strains</b>		
LF82	<i>E. coli</i> isolated from an ileal biopsy sample of a patient with CD, Ery <sup>R</sup>	(5)
LF82-Δ <i>lpfA</i>	LF82 isogenic mutant with <i>lpfA</i> gene deleted	This study
LF82-Δ <i>fimA</i>	LF82 isogenic mutant with <i>fimA</i> gene deleted	This study
LF110	<i>E. coli</i> isolated from an ileal biopsy sample of a patient with CD	(9)
LF110-Δ <i>lpfA</i>	LF110 isogenic mutant with <i>lpfA</i> gene deleted	This study
MG1655	<i>E. coli</i> K-12 serotype O:K:H48/K-	Laboratory stock
<b>Plasmids</b>		
pKOBEG	pBAD cloning vector harboring λ phage redγβα operon; Cm <sup>R</sup>	(47)
pBAD24	<i>E. coli</i> cloning vector, Amp <sup>R</sup>	(48)
pBAD24- <i>lpf</i>	pBAD24 harboring the 5454-bp EcoRI-HindIII fragment containing the entire <i>lpf</i> operon of LF82	This study



**Table S2.** Oligonucleotides used and PCR product sizes

Primer name	Oligonucleotide sequence (5'-3')	PCR product size (bp)	Use
IM <i>/pfA</i> -LF82-1	ACAGATAATCTGTTGCCATTGAGAGATAATCGTTCC GTCTGGATCGATTACGTAGGCTGGAGCTGCTTC	1495	LF82- $\Delta$ <i>/pfA</i> isogenic mutant construction
IM <i>/pfA</i> -LF82-2	CGTTGTATGAACAACATCAAGCATATTTATCTATATA AATGGAGTTATAACATATGAATATCCTCCTTAG		
<i>/pfA</i> <sub>LF82-1</sub>	GGCCTTCTTTTCAGACGGTA	199	Isogenic mutant verification
<i>/pfA</i> <sub>LF82-2</sub>	CTGGAAAACCTGCGATATCTCC		Prevalence analysis of <i>/pfA</i> <sub>LF82</sub>
<i>/pfA</i> <sub>LF82-3</sub>	GCGCCAGAACGGCAAGGC	713	Isogenic mutant verification
<i>/pfA</i> <sub>LF82-4</sub>	AACGCCATTTGTATAATCTGCG		
IM <i>/pfA</i> -LF110-1	ATAACGACTCCCTGGCCAAAGCCAACTGAATAAAAA GGCCCTTGATAAAATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	1495	LF110- $\Delta$ <i>/pfA</i> isogenic mutant construction
IM <i>/pfA</i> -LF110-2	ATATAAGTGATGATTCATGTAAAGGATATATTAT CAATGGAGTTTTTCATATGAATATCCTCCTTAG		
<i>/pfA</i> <sub>Shigella-1</sub>	CCGCAATCGCTTGTCCTG	200	Isogenic mutant verification
<i>/pfA</i> <sub>Shigella-2</sub>	TGCATTTTCAGGTGTAGGTAG		Prevalence analysis of <i>/pfA</i> <sub>Shigella</sub>
<i>/pfA</i> <sub>Shigella-3</sub>	AATGACAAAGCCCTGCATAAG	941	Isogenic mutant verification
<i>/pfA</i> <sub>Shigella-4</sub>	TTAATGTCTGATAACAAACTTGA		
K1	CAGTCATAGCCGAAATACCCCT		Kanamycin resistance cassette amplification (47)
K2	CGGTGCCCTGAAATGAACTGC		
Kt	CGGCCACAGTCGATGAATCC		
EcoRI- <i>/pf</i> HindIII- <i>/pf</i>	CCCAAGCTTGGGTTATTCGTACTGAACCCGTAAAATC GGAATCCATAAATGAAAAAGGTTCTGTTGCC	5454	Transcomplementation of LF82- $\Delta$ <i>/pfA</i>
<i>/pfA</i> <sub>Salm.-1</sub> <i>/pfA</i> <sub>Salm.-2</sub>	CTCTAATACCAAAGTTAAC TTGTTGCAACGTAGTTAGCG	218	Prevalence analysis of <i>/pfA</i> <sub>Salmonella</sub>
<i>/pfA</i> <sub>EHEC-<i>lptI</i>-1</sub> <i>/pfA</i> <sub>EHEC-<i>lptI</i>-2</sub>	AAAGCCAAATGTGAGCTTTAG ACGTAGTTAGCGGTAAAGTA	200	Prevalence analysis of <i>/pfA</i> <sub>EHEC-<i>lptI</i></sub>
<i>/pfA</i> <sub>EHEC-<i>lptI</i>-1</sub> <i>/pfA</i> <sub>EHEC-<i>lptI</i>-2</sub>	CGAATAGCTACGCCTTTTCG CTGACTCAATGCCCGGAAA	200	Prevalence analysis of <i>/pfA</i> <sub>EHEC-<i>lptI</i></sub>





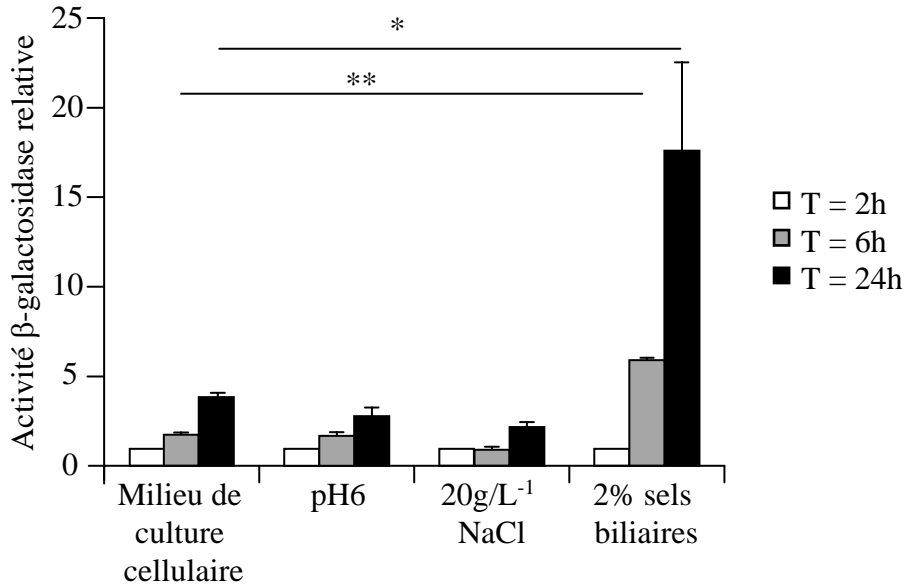
**Figure 45 : Observation par microscopie électronique à transmission de la souche de *E. coli* ORN172 exprimant l'opéron *lpfABCDE* cloné de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. (Baumler and Heffron, 1995).**

## Commentaires de la publication n°2

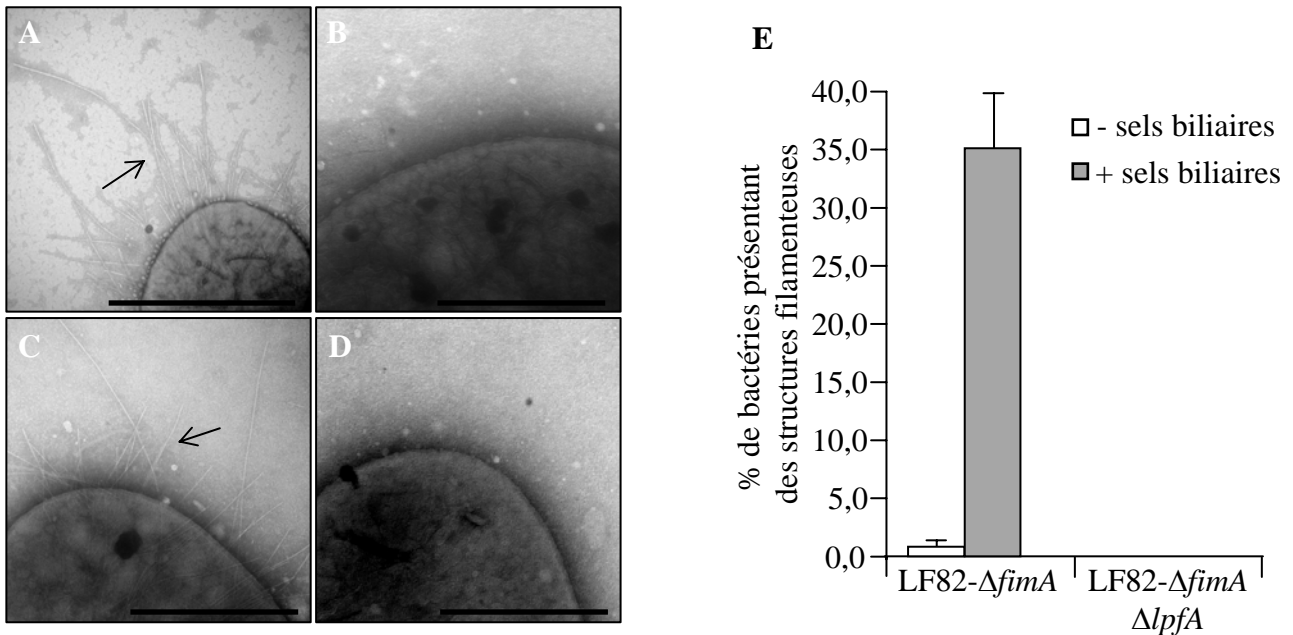
Basé sur les observations cliniques ayant rapportées que les plaques de Peyer sont le siège des lésions aphtoides très précoces de la maladie de Crohn, le but de cette étude était de caractériser le pouvoir d'interaction des souches AIEC avec les plaques de Peyer (Fujimura *et al.*, 1996; Gullberg and Soderholm, 2006; Morson, 1972). Une étude récente réalisée au Japon avait permis de montrer que la glycoprotéine GP2, spécifiquement exprimée à la surface des cellules M présentes dans l'épithélium recouvrant les plaques de Peyer, permettait la liaison d'entérobactéries commensales et pathogènes, tels que *Salmonella enterica* serovar Typhimurium et *Escherichia coli* (Hase *et al.*, 2009). Ce mécanisme d'interaction avec les cellules M, ainsi que la mise en place de la réponse immunitaire qui en découle, implique l'adhésine FimH, localisée à l'extrémité des pili de type 1 bactériens. Dans un premier temps, nous avons étudié si la souche AIEC de référence LF82 était capable de cibler les plaques de Peyer associées à l'épithélium intestinal. Les résultats obtenus montrent une forte interaction de la souche AIEC LF82 avec l'épithélium associé aux plaques de Peyer murines qui dépend en partie de l'expression des pili de type 1 et de la présence de la glycoprotéine GP2. Cependant, les études d'interactions réalisées avec un mutant isogénique LF82- $\Delta$ fimA ou en présence d'anticorps bloquant anti-GP2 montrent qu'il existe, en parallèle, un autre mécanisme mis en jeu, puisque la souche LF82 interagit toujours avec l'épithélium associé aux plaques de Peyer lorsque les pili de type 1 ne sont pas exprimés ou que le récepteur est bloqué.

✓ **Les long polar fimbriae sont impliqués dans le ciblage de l'épithélium associé aux plaques de Peyer.**

Un criblage du génome de la souche AIEC de référence LF82 a alors été réalisé et a indiqué la présence d'un opéron *lpf*, codant les long polar fimbriae (LPF) (Miquel *et al.*, 2010). L'analyse de la bibliographie révèle que les LPF, décrits pour la première fois en 1995 (Baumler and Heffron, 1995), seraient impliqués dans le ciblage des plaques de Peyer par *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Baumler *et al.*, 1996a). L'analyse de la structure des LPF a révélé, suite au clonage de l'opéron *lpfABCDE* de *Salmonella* et son expression chez la souche de *E. coli* ORN172 (**Figure 45**), qu'il s'agissait de structures filamenteuses



**Figure 46 : Analyse de l'activation du promoteur de l'opéron *lpf*.** Mesure de l'activité β-galactosidase suite au clonage de la séquence ADN précédant l'opéron *lpf* en amont du gène *lacZ* dans le plasmide pRS550 (Simons *et al.*, 1987). Les bactéries AIEC LF82 transformées avec cette construction ont été cultivées en milieu de culture cellulaire (EMEM + 10% sérum de veau décomplémenté), en milieu de culture cellulaire à pH = 6, en milieu de culture cellulaire + 20g/L<sup>-1</sup> de NaCl, ou en milieu de culture cellulaire + 2% de sels biliaries, et l'activité β-galactosidase a été déterminée après 2h, 6h et 24h de culture bactérienne. Les résultats sont exprimés en activité β-galactosidase mesurée après 6h ou 24h de culture comparativement à l'activité β-galactosidase mesurée après 2h de culture, définie comme 1. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.



**Figure 47 : Observation par microscopie électronique à transmission de l'expression de structures filamenteuses par la souche AIEC LF82, et par les mutants isogéniques LF82-ΔfimA et LF82-ΔfimA-ΔlpfA cultivés en présence ou en absence de sels biliaries.** Les souches LF82 (A), LF82-ΔfimA (B-C) et LF82-ΔfimA-ΔlpfA (D) ont été cultivés en absence (A-B) ou en présence de 2% de sels biliaries (C-D) puis déposées sur grille de cuivre carbonée et colorée négativement à l'acide phosphotungstique 10%, pH 6,8. Les grilles ont été observées avec un microscope électronique Hitachi H-7650, sous une tension d'accélération de 80 kV, échelle : 500nm. E. Cent bactéries ont été observées, et le pourcentage de bactéries présentant à leur surface des structures filamenteuses a été déterminé.

longues et présentes aux pôles de la bactérie. De par ces deux caractéristiques, les auteurs les ont dénommés *long polar fimbriae*, ou LPF (Baumler and Heffron, 1995).

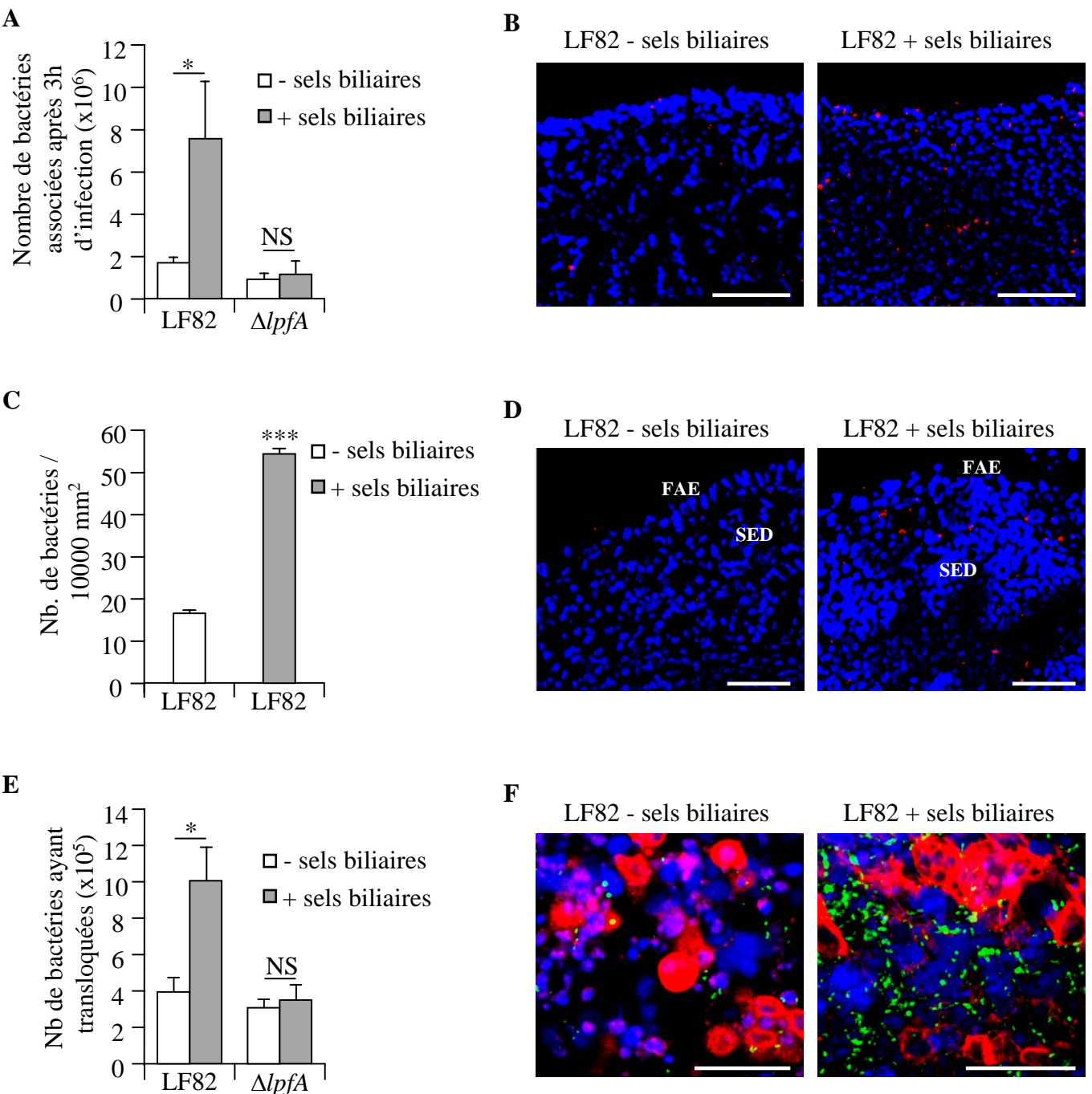
Avant d'étudier l'implication éventuelle des LPF dans la virulence de la souche AIEC LF82, des études complémentaires non présentées dans cette publication ont été conduites afin de déterminer les conditions de culture permettant une expression maximale des LPF. Pour cela, la séquence ADN située en amont de l'opéron *lpf* a été clonée dans un plasmide possédant le gène rapporteur *lacZ* codant pour une  $\beta$ -galactosidase. Les résultats obtenus, montrés en **figure 46**, indiquent que, contrairement à une forte osmolarité ou à un pH acide qui n'induisent pas l'activation de l'expression de l'opéron *lpf*, la présence de 2% de sels biliaires conduit à une très forte activation transcriptionnelle de l'opéron *lpf*. L'observation expérimentale montrant qu'une forte osmolarité, connue pour induire l'activation de la voie de signalisation dépendante du facteur  $\sigma^E$ , n'active pas la transcription de l'opéron *lpf*, est en accord avec les résultats précédemment observés qui montraient que l'opéron *lpf* ne semblerait pas être sous la dépendance d'une régulation par le facteur  $\sigma^E$ .

Dans le but de visualiser les LPF chez la souche AIEC LF82, des analyses complémentaires de microscopie électronique à transmission ont été réalisées, et révèlent que le mutant isogénique LF82- $\Delta$ *fimA*, incapable de produire des pili de type 1, présente quand même à sa surface des structures filamenteuses lorsque les bactéries ont été cultivées en présence de 2% de sels biliaires, et ce chez 35% des bactéries (**Figure 47**). De telles structures filamenteuses ne sont observées que chez 1,5% des bactéries LF82- $\Delta$ *fimA* cultivées en absence de sels biliaires, et ne sont pas du tout retrouvées chez le double mutant isogénique LF82- $\Delta$ *fimA*- $\Delta$ *lpfA* (**Figure 47**). Toutefois, il reste à confirmer que les structures filamenteuses observées sont bien des LPF grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-LPF spécifique. Nos différents essais d'obtention d'anticorps anti-LPF n'ont pas abouti au cours de cette thèse, même les anticorps dirigés contre un peptide synthétique prédit pour être exposé à la surface de la sous-unité majeure LpfA. Ces résultats préliminaires sembleraient indiquer que, chez la souche AIEC de référence LF82, les LPF seraient exprimés uniformément à la surface des bactéries, et qu'il s'agirait de structures moins longues que celles précédemment observées chez *Salmonella* et très similaires à des pili de type 1 (**Figure 47**). D'ailleurs ce résultat est à mettre en relation avec les homologies de séquences observées pour les protéines codant les pili de type 1 et les LPF, comme le montre le **tableau 9**.



**Tableau 9 : Tableau comparatif de la sous-unité majeure, de la chaperonne et de la protéine d'ancrage des pili de type 1 et des *long polar fimbriae*.**

<b>Protéines comparées et fonctions</b>	<b>Nombre d'acides aminés identiques / Nombre d'acides aminés total (%)</b>	<b>Pourcentage d'homologie</b>
FimA / LpfA, sous-unité majeure	60/175 ( <b>34 %</b> )	<b>51 %</b>
FimC / LpfB, chaperonne	88/229 ( <b>38 %</b> )	<b>60 %</b>
FimD / LpfC, protéine d'ancrage	380/880 ( <b>43 %</b> )	<b>61 %</b>



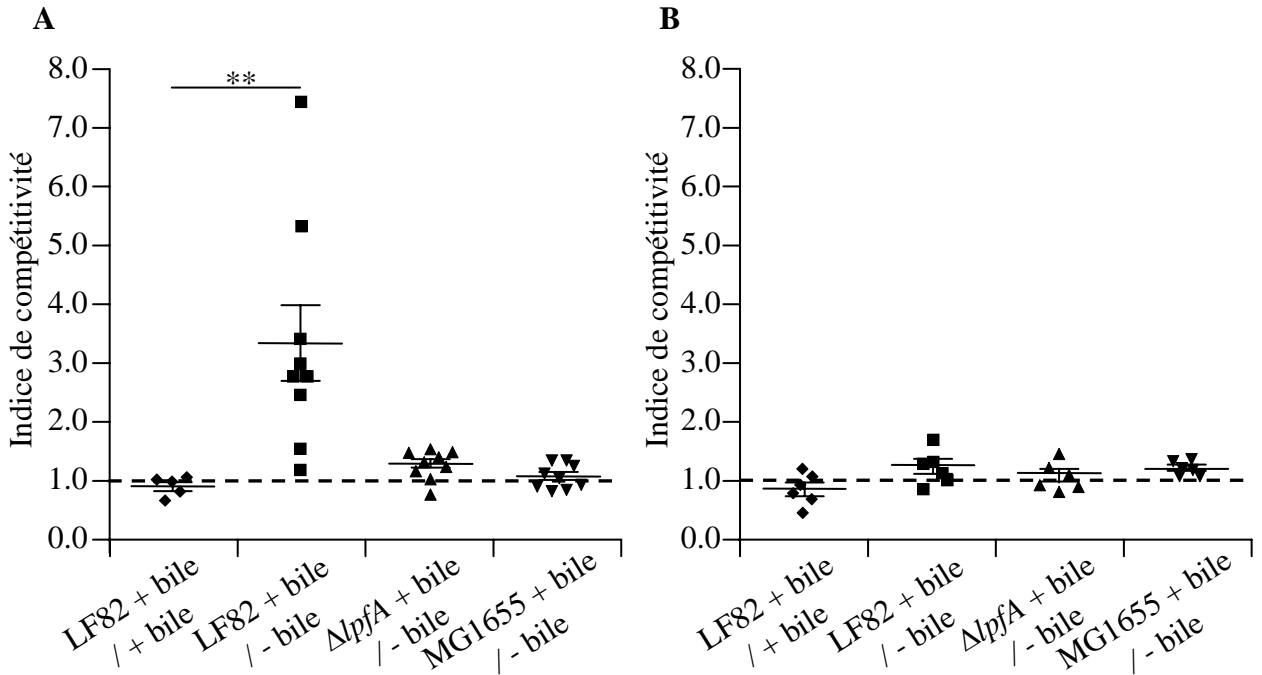
**Figure 48 : Analyse de l'interaction de la souche AIEC de référence LF82 sauvage et du mutant isogénique LF82- $\Delta lpfA$ , cultivés en présence ou en absence de 2% de sels biliaries, avec les plaques de Peyer murines (A-B), les plaques de Peyer humaines (C-D), et les cellules M (E-F). A-B. Quantification (A) et visualisation (B) de l'interaction de la souche LF82 et du mutant isogénique LF82- $\Delta lpfA$  avec les plaques de Peyer murines. C-D. Quantification (C) et visualisation (D) de l'interaction de la souche LF82 et du mutant isogénique LF82- $\Delta lpfA$  avec les plaques de Peyer humaines. FAE, « Follicle-associated epithelium », SED, « Sub-epithelium domain », . E-F. Mesure de la translocation (E) et visualisation de l'interaction (F) de la souche LF82 et du mutant isogénique LF82- $\Delta lpfA$  avec le modèle de cellules M *in vitro*. Les méthodologies utilisées sont les mêmes que celles utilisées dans la publication N°2. NS, non significatif, \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001.**

A la suite des ces résultats, l'ensemble des études phénotypiques réalisées a été réalisé en utilisant des bactéries ayant cultivées en présence de 2% de sels biliaries. L'implication des LPF dans la virulence de la souche LF82 a été étudiée, et révèle que ce facteur est primordial pour l'interaction des bactéries AIEC avec les plaques de Peyer murines, mais aussi humaines. L'analyse au niveau cellulaire de cette interaction AIEC-plaque de Peyer a montré, grâce à l'utilisation de modèle *in vitro* et *in vivo*, que les LPF sont impliqués dans le ciblage spécifique des cellules M à la surface de l'épithélium des plaques de Peyer. Des résultats complémentaires indiquent également qu'en présence de 2% de sels biliaries, la souche AIEC de référence LF82 présente un pouvoir d'interaction avec les plaques de Peyer et de translocation à travers une monocouche de cellules M fortement augmenté, et ceci de manière LPF-dépendante (**Figure 48**). L'analyse par indice de compétitivité confirme que la souche LF82 est fortement augmentée dans son pouvoir d'interaction avec les plaques de Peyer suite à une culture en présence de sels biliaries (**Figure 49**). Ces résultats montrent également que l'augmentation de l'interaction est liée à la présence de l'opéron *lpf* chez la bactérie, ainsi qu'à la présence de plaques de Peyer au niveau de la muqueuse intestinale (**Figure 48**). De plus, les phénotypes d'interaction avec les plaques de Peyer et de translocation à travers une monocouche de cellules M sont identiques entre la souche LF82 sauvage cultivée en absence de sels biliaire et le mutant isogénique LF82- $\Delta$ *lpfA*. Ces résultats tendent à montrer qu'en absence de sels biliaries, l'expression des LPF est quasi nulle, expliquant que les phénotypes associés aux LPF ne soient observables que lorsque les bactéries ont été cultivées en présence de sels biliaries.

✓ **La prévalence de l'opéron *lpf* est augmentée chez les patients atteints de maladie de Crohn comparativement aux patients contrôles.**

Une banque de souches de *E. coli* isolées de patients atteints de maladie de Crohn ou de patients contrôles a été utilisée pour l'étude de la prévalence de l'opéron *lpf* en fonction du phénotype AIEC ou non-AIEC souches. L'opéron *lpf* a été retrouvé avec une prévalence significativement augmentée chez les patients atteints de MC (47,3 %) comparativement aux patients contrôles (17,2 %). Ainsi, contrairement aux pili de type 1 qui sont exprimés par toute les bactéries de la famille des Enterobacteriaceae (Johnson, 1991), l'expression des LPF semblent être une caractéristique spécifique aux souches AIEC.





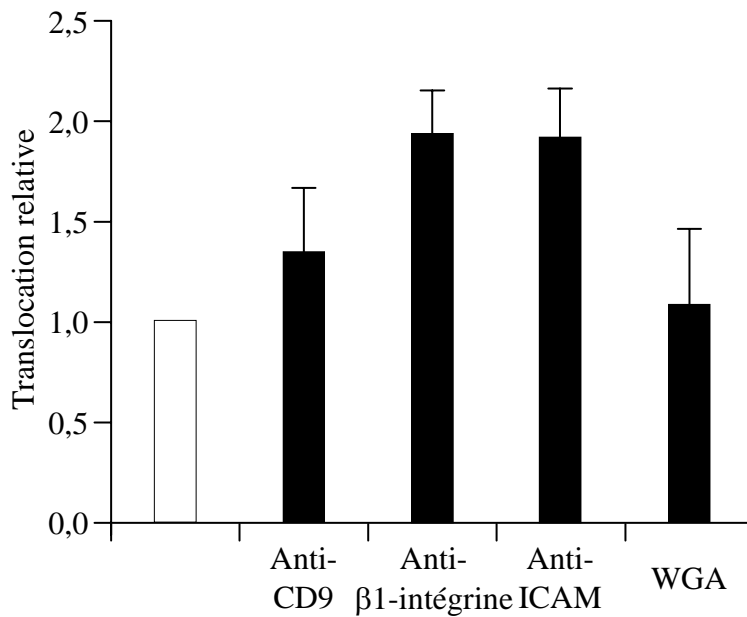
**Figure 49 : Effet de la présence de sels biliaries sur l'interaction des bactéries avec la muqueuse intestinale. A.** Interaction des bactéries LF82, LF82- $\Delta$ *lpfA* et MG1655 cultivées en présence ou en absence de 2% de sels biliaries avec des plaques de Peyer murines. Les résultats sont exprimés en indice de compétitivité (nombre de bactéries numérées en condition 1 / nombre de bactéries numérées en condition 2). Brièvement, une anse ligaturée contenant une plaques de Peyer a été réalisée en modèle murin, puis infectée par un mélange de deux bactéries. 5h après l'infection, les plaques de Peyer ont été récupérées et les deux bactéries simultanément injectées ont été quantifiées. **B.** Mesure de l'interaction des bactéries LF82, LF82- $\Delta$ *lpfA* et MG1655 cultivées en présence ou en absence de 2% de sels biliaries avec la muqueuse intestinale en absence de plaques de Peyer. Les résultats sont exprimés en indice de compétitivité. \*\*P < 0.01.

L'analyse de la prévalence de l'opéron *lpf* a également indiqué que certaines souches AIEC expriment un opéron *lpf* variant comparé à celui observé chez la souche AIEC de référence LF82. Néanmoins, les analyses phénotypiques réalisées dans cette étude montrent que ce variant joue exactement le même rôle, en permettant également une forte interaction des bactéries avec les plaques de Peyer.

✓ **L'inactivation du gène *Nod2* conduit à une augmentation de l'interaction des bactéries AIEC avec ces plaques de Peyer de manière LPF-dépendante.**

Une précédente étude avait montré que le nombre de plaques de Peyer et de follicules lymphoïdes est augmenté chez des souris invalidées pour le gène *Nod2* comparativement à des souris sauvages (Barreau *et al.*, 2007). Il a également été rapporté une augmentation du nombre de cellules M ainsi qu'une augmentation de translocation de levures ou de bactéries au niveau des plaques de Peyer de souris invalidées pour le gène *Nod2* comparativement à des souris sauvages (Barreau *et al.*, 2007; Barreau *et al.*, 2010). Ces études indiquent qu'une déficience de NOD2 induit des anomalies au niveau des plaques de Peyer. Le modèle de souris invalidées pour le gène *Nod2* étant disponible au laboratoire, nous avons voulu savoir si l'augmentation du nombre de cellules M pouvait jouer un rôle dans l'interaction des bactéries AIEC avec les plaques de Peyer. Les résultats obtenus confirment une augmentation du nombre de cellules M au niveau de l'épithélium associé aux plaques de Peyer, et indiquent que cette augmentation du nombre de cellules M serait à l'origine d'une augmentation de l'interaction des bactéries AIEC avec les plaques de Peyer de ces animaux. En effet, cette augmentation de l'interaction n'est pas retrouvée lors de l'utilisation du mutant isogénique LF82- $\Delta$ *lpfA* incapable de produire les LPF. Ces données indiquent que les bactéries AIEC pourraient tirer avantage d'une susceptibilité génétique pour cibler les plaques de Peyer.

En conclusion, cette deuxième étude a permis l'identification des LPF comme facteur bactérien essentiel pour le ciblage des plaques de Peyer par les bactéries AIEC. Ces résultats laissent ainsi supposer que, de part leurs capacités à cibler les plaques de Peyer, les bactéries AIEC associées à la maladie de Crohn pourraient jouer un rôle dans l'établissement des lésions précoces de la pathologie. Cette étude est une nouvelle avancée dans la compréhension des mécanismes de pathogénicité des bactéries AIEC, et identifie l'existence d'une potentielle coévolution entre des bactéries AIEC produisant des LPF et l'hôte



**Figure 50 : Mesure de la translocation de la souche AIEC de référence LF82 à travers une monocouche de cellules M.** La translocation de la souche LF82 à travers une monocouche de cellules M n'ayant pas subi de prétraitement, définie comme 1, a été comparée à la translocation observée suite à un prétraitement des cellules M avec des anticorps anti-CD9, anti-β1-intégrine, anti-ICAM (*Intercellular adhesion molecule*) ou suite à un prétraitement avec de l'agglutinine de germes de blé (Wheat Germ Agglutinin, WGA).

présentant, de par les mutations dans le gène *Nod2*, un nombre plus important de plaques de Peyer et de cellules M.

Des perspectives sont envisagées au laboratoire afin d'approfondir ce travail. Il serait tout d'abord intéressant d'identifier le récepteur aux LPF exprimé à la surface des cellules M. Les études réalisées dans ce travail montrent que l'addition d' $\alpha$ -D-mannopyranoside ne bloque pas l'implication des LPF dans l'interaction des bactéries AIEC aux plaques de Peyer, montrant ainsi que les LPF ne semblent pas être de type lectines à mannose. De plus, des expériences supplémentaires ayant pour but d'étudier la translocation des bactéries AIEC à travers une monocouche de cellules M obtenue *in vitro* et traitée avec différents anticorps reconnaissant des molécules spécifiquement exprimées à la surface des cellules M (*wheat germ agglutinin* (WGA) (Jepson *et al.*, 1995),  $\beta$ 1-intégrine (Clark *et al.*, 1998), CD9 (Gullberg *et al.*, 2006) et *intercellular adhesion molecule* (ICAM) (Gullberg *et al.*, 2000)) ont indiqué qu'aucune de ces molécules ne serait impliquée dans la reconnaissance des cellules M par les LPF (**Figure 50**). L'identification du récepteur aux LPF devra de plus prendre en compte la complexité de l'expression des marqueurs spécifiques aux cellules M, variant entre les espèces, et notamment entre la souris et l'Homme.

Cette étude soulève également la question de l'implication potentielle d'autres bactéries pathogènes exprimant les LPF dans la pathogénèse de la maladie de Crohn. Cette idée est confortée par l'observation montrant que les infections gastro-intestinales, comme par exemple les gastroentérites causées par des souches de *Salmonella* non-typhoïde ou par des souches de *Campylobacter*, augmentent le risque de développement de MICI (Gradel *et al.*, 2009; Porter *et al.*, 2008). Ces données montrent l'importance de réaliser de nouvelles études épidémiologiques dans le but de rechercher des bactéries pathogènes, notamment entéro-invasives et exprimant les LPF, au niveau des biopsies de patients atteints de maladie de Crohn. Cette approche pourra permettre d'élucider si les bactéries à Gram négatif intra-mucosales observées chez 73% des patients atteints de maladie de Crohn expriment les LPF, car 58% de ces bactéries internalisées n'ont pas été identifiées en tant que *E. coli* (Martin *et al.*, 2004).

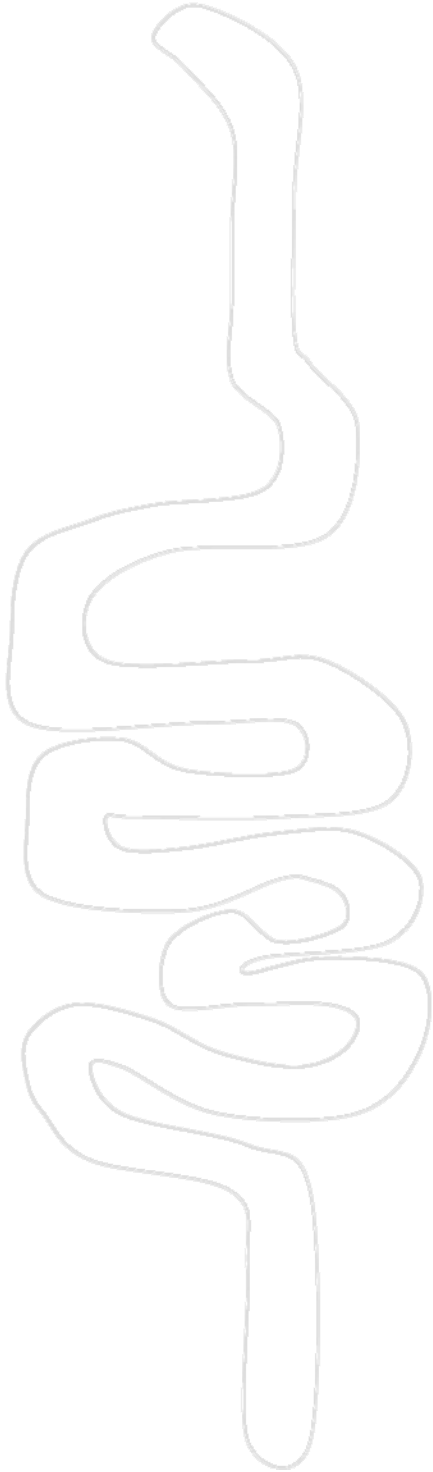
Enfin, l'élaboration d'un modèle animal pouvant permettre de mimer les lésions précoces observées chez les patients atteints de maladie de Crohn est envisagé au laboratoire. De précédentes observations ont permis de montrer que les souris *Nod2*<sup>-/-</sup>, disponible au



laboratoire, ne développent aucune colite en réponse à une infection par des bactéries AIEC (N. Barnich, données non publiées), indiquant que d'autres facteurs environnementaux ou génétiques sont nécessaires. Dans ce but, la création de souris *Nod2*<sup>-/-</sup> et exprimant le récepteur CEACAM6 au niveau iléal, via le promoteur de la villine, est en cours au laboratoire. L'utilisation d'un tel modèle animal, combinant à la fois l'inactivation du récepteur intracytoplasmique NOD2 connue pour entraîner une augmentation du nombre de plaques de Peyer et du nombre de cellules M et l'expression du récepteur CEACAM6 nécessaire à la colonisation de la muqueuse iléale par les bactéries AIEC, pourrait élucider l'importance *in vivo* de l'entrée des bactéries AIEC par les plaques de Peyer via l'expression des *long polar fimbriae*.



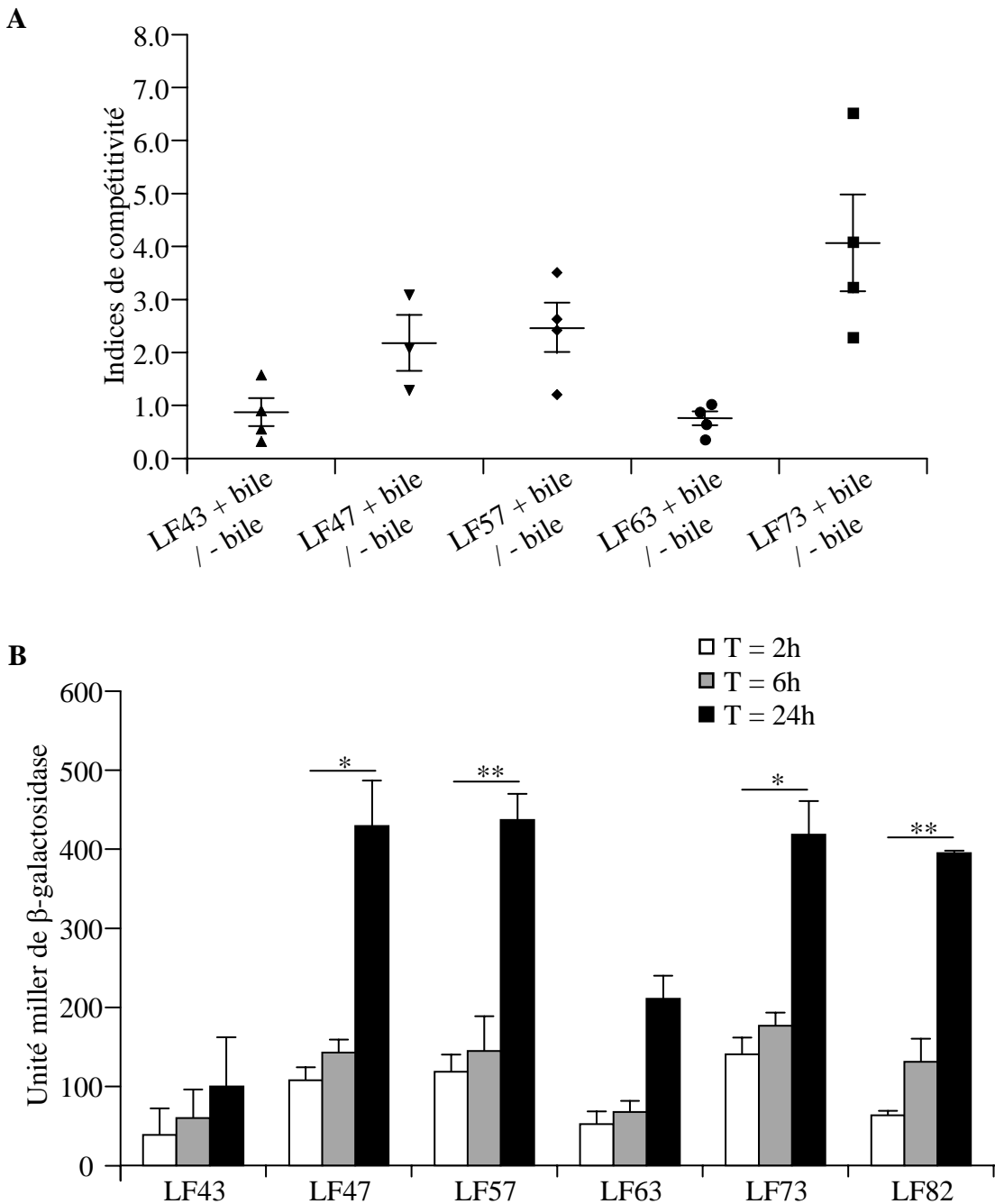
*RESULTATS*  
*COMPLEMENTAIRES*











**Figure 51 : Analyse de l'impact d'une culture des bactéries AIEC en présence de sels biliaries sur leur interaction avec les plaques de Peyer (A) et l'expression de l'opéron *lpf* (B).** **A.** Indice de compétitivité de l'interaction des bactéries AIEC LF43, LF47, LF57, LF63 et LF73 cultivées en présence ou en absence de 2% de sels biliaries avec des plaques de Peyer murines. **B.** Les séquences en ADN amont de l'opéron *lpf* des souches LF43, LF47, LF57, LF63, LF73, LF82 ont été clonées en amont du gène *lacZ* dans le plasmide pRS550 (Simons *et al.*, 1987) et l'activité  $\beta$ -galactosidase a été mesurée. Les résultats sont exprimés en unité millier de  $\beta$ -galactosidase après 2h, 6h et 24h de culture bactérienne. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

L'ensemble des expériences de la publication N°2 a été réalisé avec des bactéries cultivées en présence d'acides biliaires, puisque nos données préliminaires suggéraient que de telles conditions étaient nécessaires pour l'observation d'un phénotype lié à l'expression des LPF. Il est de plus bien établi que la présence de sels biliaires intestinaux est un facteur environnemental important pour la virulence de nombreuses bactéries pathogènes, telles que *Shigella* spp. (Pope *et al.*, 1995), *Salmonella* spp. (Wang *et al.*, 2010), *Vibrio parahaemolyticus* (Hsieh *et al.*, 2003) and *Campylobacter jejuni* (Dolg *et al.*, 1996). Ainsi, dans le but de confirmer les résultats obtenus avec la souche AIEC de référence LF82, d'autres souches AIEC possédant l'opéron *lpf* ont été testées pour leurs capacités d'interaction avec les plaques de Peyer après culture des bactéries en présence ou en absence de sels biliaires, et par mesure de l'indice de compétitivité (**Figure 51A**). De manière intéressante, les résultats obtenus permettent d'identifier deux groupes de bactéries AIEC. Un groupe, comprenant les souches LF43 et LF63, ne présente pas un pouvoir d'interaction avec les plaques de Peyer augmenté suite à la culture des bactéries en présence de sels biliaires. Inversement, un deuxième groupe, comprenant les souches LF47, LF57 et LF73, présente un pouvoir d'interaction avec les plaques de Peyer augmenté suite à la culture des bactéries en présence de sels biliaires, et présente ainsi un phénotype très similaire à celui observé pour la souche de référence LF82.

Ces résultats nous ont donc conduits à analyser l'activation du promoteur de l'opéron *lpf* en présence de sels biliaires pour ces différentes souches AIEC. Les mesures d'activités  $\beta$ -galactosidase réalisées révèlent deux groupes de souches, en accord avec les résultats d'interaction précédemment observés (**Figure 51B**). Ainsi, les souches LF43 et LF63, connues pour ne pas avoir une capacité d'interaction avec les plaques de Peyer augmentée suite à la culture en présence de sels biliaires, ne présentent qu'une faible activation du promoteur de l'opéron *lpf* lorsque les bactéries sont cultivées en présence de sels biliaires. Inversement, les souches LF47, LF57 et LF73, connues pour avoir une capacité d'interaction avec les plaques de Peyer fortement augmentée suite à la culture en présence de sels biliaires, présentent une forte activation du promoteur de l'opéron *lpf* en présence de sels biliaires, similaire à celle observée pour la souche AIEC de référence LF82.

L'analyse des séquences nucléotidiques précédant l'opéron *lpf* chez ces 6 souches AIEC (LF43, LF47, LF57, LF63, LF73 et LF82) révèle que les deux groupes précédemment observés sur les caractéristiques phénotypiques sont retrouvés (**Figure 52**). Ainsi, les souches

<u>Souches</u>	<u>Position</u>																													
	-327/326/325	-327	-326	-325	-312	-296	-295	-283	-267	-262	-261	-256	-242	-241	-240	-237	-234	-232	-231	-229	-228	-222	-218	-217	-213	-211	-210	-207	-206	-205
LF82	TAG	T	A	G	G	T	G	G	T	T	T	G	G	G	C	C	A	A	A	T	G	T	C	G	A	A	C	T	C	T
LF47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LF57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LF73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LF43	-	-	-	-	A	G	T	A	#	A	C	A	A	A	T	T	T	C	C	C	A	A	T	A	G	T	T	A	T	A
LF63	-	-	-	-	A	G	T	A	#	A	C	A	A	A	T	T	T	C	C	C	A	A	T	A	G	T	T	A	T	A

<u>Souches</u>	<u>Position</u>																														
	-186	-182	-174	-173	-172	-169	-168	-165	-164	-162	-161	-160	-159	-158	-153	-151	-148	-143	-129	-116	-109	-96	-82	-74	-72	-53	-25	-24	-23	+1/2/3	
LF82	T	T	A	C	G	A	A	A	#	T	T	G	C	G	A	G	T	G	C	A	A	G	A	A	G	A	T	T	T	<u>ATG</u>	
LF47	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-
LF57	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LF73	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LF43	A	C	#	T	C	C	G	G	G	A	C	C	T	T	G	A	C	A	T	G	G	T	C	G	A	C	-	-	A	-	-
LF63	A	C	#	T	C	C	G	G	G	A	C	C	T	T	G	A	C	A	T	G	G	T	C	G	A	C	-	A	T	-	-

**Figure 52 : Comparaison des séquences d'ADN précédant l'opéron *lpf* des souches LF43, LF47, LF57, LF63, LF73 et LF82.** Seuls les polymorphismes sont représentés. # représente les insertions/délétions. Le codon ATG de la protéine LpfA est représenté aux positions +1/2/3, et le codon stop TAG de la protéine YhjX est représenté aux positions -327/326/325.

LF43 et LF63 présentent une région d'ADN en amont de l'opéron *lpf* identique à 100%, les souches LF47, LF57, LF73 et LF82 présentent elles aussi une séquence ADN en amont de *lpf* identique à 100%, mais ces deux séquences ADN ne présentent que 84% d'identité en raison de 52 substitutions et 3 délétions-insertions.

Dans la littérature, plusieurs études se sont intéressées à la régulation de l'expression de l'opéron *lpf*. Par exemple, la souche de EHEC de référence 8624 possède deux opérons *lpf*, et il a pu être montré que la protéine de type histone H-NS (histone-like nucleoid-structuring protein) se lie à la séquence régulatrice de l'opéron *lpf1* pour en inhiber sa transcription, tandis que la protéine régulatrice Ler inhibe l'action de H-NS et permet ainsi à l'opéron *lpf1* d'être exprimé (Rojas-Lopez *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2007a; Torres *et al.*, 2008). Il a également été montré que l'expression de l'opéron *lpf1* était régulé différemment en fonction de la phase de croissance bactérienne, et en réponse à l'osmolarité et au pH, et que l'expression de l'opéron *lpf2* était induite lors de la fin de phase exponentielle de croissance, et suite à une carence en fer (Torres *et al.*, 2007b). Toutefois, ces différentes études n'avaient pas abordé l'expression des opérons *lpf* en réponse aux sels biliaires, et il serait intéressant d'étudier si une telle régulation est retrouvée chez les souches EHEC.

De manière intéressante, le tropisme préférentiel des bactéries AIEC pour l'iléon pourrait être mis en relation avec la notion de présence de sels biliaires au niveau iléal. En effet, les acides biliaires sont soumis à la circulation entéro-hépatique, qui les libère au niveau du duodénum et les réabsorbe au niveau de l'iléon distal, expliquant la faible concentration en acide biliaire observée au niveau colique (Hofmann, 1999). Ainsi, les données décrites dans ce travail montrant que la présence de sels biliaires serait importante pour la virulence des bactéries AIEC pourraient expliquer pourquoi une plus forte prévalence des souches AIEC est observée au niveau iléal des patients atteints de MC (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004).

Il serait important d'identifier, au sein du promoteur de l'opéron *lpf*, la ou les séquences nucléotidiques impliquées dans la régulation de l'opéron par les sels biliaires. Il a été rapporté, chez *E. coli* K-12, une activation de la transcription en réponse à la présence de sels biliaires pour les gènes *micF*, *osmY*, et *dinD* impliqués dans la réponse au stress oxydant et aux dommages de l'ADN (Bernstein *et al.*, 1999), et pour le gène codant l'adhésine non-fimbriale LDA de souches d'EPEC (Torres *et al.*, 2007c), mais le mécanisme moléculaire de cette activation de transcription reste pour le moment inconnue.

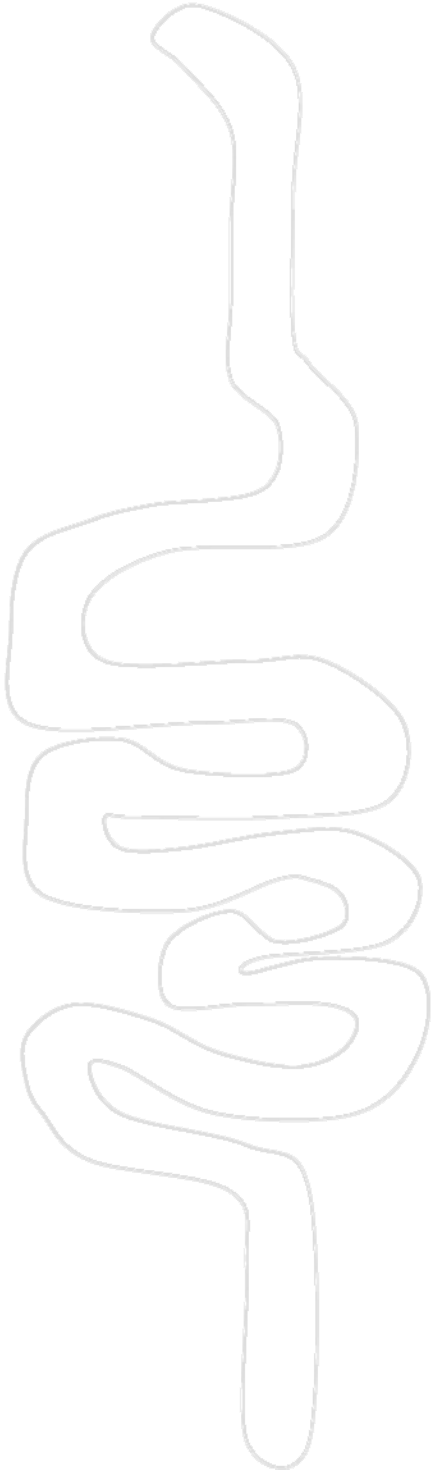


Enfin, des études cliniques ont permis de mettre en évidence des modifications de la composition de la bile chez les patients atteints de MC (Lapidus *et al.*, 2006; Marks *et al.*, 1977; Pereira *et al.*, 2003), avec notamment une augmentation de la concentration en ursodeoxycholate (Rutgeerts *et al.*, 1986) et une diminution de la concentration en acide deoxycholic (Lapidus and Einarsson, 1998). L'ensemble de ces données indique qu'il serait important de tester l'implication des variations de sels biliaries sur le microbiote intestinal en général et plus particulièrement sur les AIEC.





*DISCUSSION -  
PERSPECTIVES*





## Discussion - Perspectives

Les lésions iléales des patients atteints de MC sont anormalement colonisées par des souches de *Escherichia coli* appartenant au pathovar AIEC (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). Cette colonisation met en jeu plusieurs propriétés de virulence, telles que le pouvoir d'adhésion et d'invasion des cellules épithéliales intestinales (Boudeau *et al.*, 1999; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004) ainsi que le pouvoir de colonisation de la muqueuse intestinale (Barnich *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2009) et la formation de biofilm (Martinez-Medina *et al.*, 2009b).

### 1- Interaction des bactéries AIEC avec la muqueuse intestinale :

L'ensemble des travaux réalisés sur la souche AIEC de référence LF82, isolée d'une biopsie iléale d'un patient atteint de MC, montre que la virulence des souches AIEC est multifactorielle et repose sur une régulation complexe de l'expression de facteurs de virulence. Différents facteurs bactériens de surface sont impliqués dans le phénotype d'adhésion et d'invasion des AIEC en cellules épithéliales intestinales en culture. Parmi eux, les pili de type 1, les vésicules de membrane externe et la protéine de membrane externe OmpC jouent un rôle majeur dans la virulence des AIEC (pour revue, Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2011).

. Il a notamment été mis en évidence que l'adhésion des AIEC aux cellules épithéliales intestinales met en jeu des pili de type 1 variants et le récepteur CEACAM6 (CarcinoEmbryonic Antigen related Cell Adhesion Molecule 6) exprimé à la surface des cellules épithéliales iléales (Barnich *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2009).

Il également été montré que chez la souche AIEC LF82, la protéine OmpC joue un rôle indirect dans la virulence en activant la voie de régulation dépendante du facteur sigma alternatif  $\sigma^E$  en conditions de forte osmolarité (Rolhion *et al.*, 2007). En effet, cette étude indique qu'un mutant isogénique LF82- $\Delta ompC$  est fortement affecté dans son pouvoir d'adhésion et d'invasion de cellules épithéliales intestinales, et de manière intéressante ce phénotype serait lié à l'absence d'activation de la voie  $\sigma^E$  chez ce mutant. Chez la souche AIEC LF82, ce facteur  $\sigma^E$  intervient dans la régulation de l'expression des flagelles, des pili



de type 1 et vraisemblablement de divers facteurs impliqués dans la virulence des bactéries AIEC, contrairement aux souches de *E. coli* non pathogènes pour lesquelles l'activation de cette voie entraîne la répression de l'expression des flagelles (Oshima *et al.*, 2002; Shin and Park, 1995). Cependant, l'ensemble des gènes régulé par la voie  $\sigma^E$  restaient à être identifiés. Dans ce cadre, il m'a été proposé d'étudier le rôle des gènes présentant une régulation dépendante du facteur sigma alternatif  $\sigma^E$  dans la virulence des souches AIEC associées à la maladie de Crohn.

### - Choix de la méthode expérimentale :

Dans le but de confirmer l'implication de la voie  $\sigma^E$  dans la virulence de la souche AIEC LF82, une stratégie visant à créer le mutant isogénique LF82- $\Delta rpoE$  et à étudier son phénotype a été envisagée. Néanmoins, un tel mutant isogénique n'a pas pu être obtenu au laboratoire, probablement du à une létalité engendrée par cette délétion. De manière intéressante, la délétion du gène *rpoE* a précédemment été obtenue chez certaines souches bactériennes, en particulier chez *Salmonella enterica* et *Vibrio cholerae* (Humphreys *et al.*, 1999; Kovacikova and Skorupski, 2002). Ainsi, la létalité de la délétion du gène *rpoE* ne semble pas être commune chez toutes les bactéries à tropisme intestinal. Dans le but d'étudier le rôle joué par la voie  $\sigma^E$  chez la souche LF82, la stratégie employée a été de surexprimer, chez la souche LF82 sauvage, les protéines RseA et RseB qui sont les deux principaux régulateurs négatifs de la voie  $\sigma^E$  en séquestrant la protéine RpoE à la membrane (De Las Penas *et al.*, 1997; Missiakas *et al.*, 1997). Basé sur le fait que le gène *rpoE* appartient lui-même au régulon  $\sigma^E$ , cette stratégie a été validée par l'observation d'une diminution significative du taux de transcrits *rpoE* suite à la surexpression de ces deux inhibiteurs.

L'utilisation de cette stratégie a permis de montrer l'importance de la voie  $\sigma^E$  chez la souche AIEC LF82 dans son pouvoir d'adhésion et d'invasion des cellules épithéliales intestinales, de formation de biofilm, et dans sa capacité à coloniser la muqueuse intestinale. De plus, l'importance de cette voie  $\sigma^E$  est confortée par l'observation montrant que cette voie est spécifiquement activée chez la souche AIEC de référence LF82 lors du processus d'adhésion. Il est à noter qu'une telle activation n'est pas retrouvée chez la souche de *E. coli* K-12 non pathogène MG1655.



### - Identification des gènes appartenant au régulon $\sigma^E$

Une étude publiée par Rhodius et collaborateurs et visant à identifier le régulon  $\sigma^E$  par analyse bioinformatique avait permis d'identifier 89 cadres ouverts de lecture (ORF) dont la transcription est potentiellement contrôlée par  $\sigma^E$  chez une souche de *E. coli* K-12 non pathogène, mais également chez 8 souches pathogènes (Rhodius *et al.*, 2006). Parmi les gènes ou ORF dont l'expression est régulée par  $\sigma^E$ , les auteurs ont trouvé qu'ils codaient des protéines chaperonnes, des protéases (localisées dans l'espace périplasmique et assurant la dégradation de protéines mal repliées), des protéines intervenant dans la synthèse et l'assemblage du LPS et des OMP (Dartigalongue *et al.*, 2001; Rezuchova *et al.*, 2003; Rhodius *et al.*, 2006), mais également des protéines qui pourraient jouer un rôle dans la virulence (Bang *et al.*, 2005; Cano *et al.*, 2001; Humphreys *et al.*, 1999; Kovacicova and Skorupski, 2002; Manganelli *et al.*, 2001; Rhodius *et al.*, 2006; Testerman *et al.*, 2002). Nous avons réalisé une même stratégie de criblage *in silico* pour la souche AIEC LF82 à partir des données de séquence de son génome (Miquel *et al.*, 2010). En parallèle, un criblage utilisant cette même séquence consensus de fixation de  $\sigma^E$  à l'ADN a également été réalisé pour le génome de la souche de *E. coli* K-12 MG1655, dans le but d'identifier de potentielles variations de régulon entre ces deux souches. Cette analyse a permis d'identifier 40 gènes potentiellement régulés par la voie  $\sigma^E$  chez ces deux souches bactériennes. Comme précédemment identifié, ces gènes ou ORF codent pour des facteurs impliqués dans la réponse à un stress périplasmique, tel que des protéases et des chaperonnes, mais aussi pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la membrane bactérienne et du lipopolysaccharide.

De manière intéressante, la comparaison entre les membres du régulon  $\sigma^E$  de la souche MG1655 et de la souche LF82 a permis d'identifier 13 gènes potentiellement régulés par  $\sigma^E$  seulement chez la souche MG1655 et 12 gènes ou ORF potentiellement régulés par  $\sigma^E$  que chez la souche LF82. Pour la suite de notre étude, nous nous sommes focalisés sur les gènes/ORF spécifiques à la souche LF82 soit car non retrouvés chez la souche MG1655, soit car seulement activés par  $\sigma^E$  chez la souche LF82 ; le but étant de caractériser des facteurs dont la transcription serait activée par la voie  $\sigma^E$  et qui seraient impliqués dans la virulence de la souche LF82. Néanmoins, une perspective intéressante à ce travail serait d'étudier le rôle joué par les facteurs potentiellement régulés par  $\sigma^E$  chez la souche MG1655 mais pas chez la souche LF82. En effet, il peut être envisagé que certains de ces facteurs jouent un rôle dans la





différence phénotypique observée entre les souches MG1655 et LF82. Ainsi, si certains facteurs potentiellement régulés par  $\sigma^E$  chez la souche LF82 semblent pouvoir être impliqués dans son phénotype AIEC, il est probable des facteurs régulés par  $\sigma^E$  que chez la souche MG1655 puissent jouer un rôle dans l'absence du phénotype AIEC. Par exemple, le gène *rutR*, potentiellement régulé par  $\sigma^E$  chez la souche MG1655, code un régulateur transcriptionnel, et pourrait donc jouer à son tour un rôle dans la régulation de gènes chez la souche MG1655, gènes pouvant potentiellement être liés à la différence de virulence observée entre les souches LF82 et MG1655.

### - Rôle de l'opéron *waaWVL* dans la virulence de la souche AIEC LF82

Les résultats obtenus *in silico* pour les gènes potentiellement régulés par  $\sigma^E$  seulement chez la souche LF82 ont été validés expérimentalement, permettant de montrer que parmi les 12 gènes identifiés, trois présentaient une régulation dépendante du facteur  $\sigma^E$ . La suite de l'étude s'est alors focalisée sur l'opéron *waaWVL*, mais l'étude du rôle joué par les facteurs codés par le cadre ouvert de lecture 1 (ORF1) et le gène *ychH* restent des perspectives très intéressantes. Par exemple, l'ORF1 n'est retrouvé que chez la souche UPEC CFT073, et l'analyse bioinformatique de sa séquence révèle la présence putative d'un domaine de liaison à l'ADN. La protéine YchH est quant à elle retrouvée chez de nombreuses souches EHEC O157:H7 et chez *Shigella flexneri*, mais est absente chez les souches de *E. coli* non pathogènes séquencées. Cette protéine possède des domaines transmembranaires ainsi qu'un peptide signal, et elle pourrait être ainsi localisée au niveau de la membrane interne. Ces données révèlent donc l'importance que pourrait jouer ces deux facteurs chez la souche AIEC de référence LF82, et l'intérêt d'étudier leur rôle dans la virulence.

Dans notre étude, nous avons pu montrer que l'activation de l'expression de l'opéron *waaWVL*, dépendante de la voie  $\sigma^E$ , est primordiale pour la formation de biofilm et la colonisation de la muqueuse intestinale par la souche AIEC de référence LF82. La forte osmolarité retrouvée en conditions gastro-intestinales, ainsi que le processus d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales observé pour les souches AIEC, conduiraient à l'activation, via la voie  $\sigma^E$ , de l'expression de l'opéron *waaWVL*. Cet opéron code trois enzymes potentiellement impliquées dans la biosynthèse du lipopolysaccharide bactérien, et notamment dans la synthèse du lipide A et de l'antigène O du LPS. De manière intéressante,



de telles enzymes ont précédemment été décrites pour jouer un rôle important dans la structure, la composition, ainsi que dans la longueur du LPS bactérien (Kaniuk *et al.*, 2004; Leipold *et al.*, 2007), ces trois caractéristiques du LPS étant connus pour affecter la virulence de bactéries pathogènes, comme montré pour *Shigella flexneri* (Sandlin *et al.*, 1996). De plus, des modifications de composition ou de longueur du LPS affecte la formation de biofilm comme rapporté chez *Pseudomonas aeruginosa* (Ciornei *et al.*, 2010) et *Escherichia coli* (Beloin *et al.*, 2006).

Des études préliminaires réalisées au laboratoire ont permis de montrer que, sur 60 souches de *E. coli* isolées de patients atteints de MC et présentant l'opéron *lpf*, 57 d'entre elles possèdent l'opéron *waaWVL*, soit 88,3%. Ainsi, il semblerait exister une corrélation entre la présence de ces deux facteurs chez les souches de *E. coli* associées à la MC. On peut émettre l'hypothèse que la formation de biofilm par les bactéries exprimant l'opéron *waaWVL* et l'opéron *lpf* soit un pré-requis pour la colonisation de la muqueuse digestive et l'apparition des lésions précoces observées au niveau des plaques de Peyer.

#### **- Perspectives concernant l'implication de l'opéron *waaWVL* dans la virulence de la souche AIEC LF82**

Plusieurs perspectives sont envisagées dans le but de confirmer et de mieux caractériser l'implication des facteurs WaaW, WaaV et WaaL dans le pouvoir pathogène des souches AIEC. Il serait tout d'abord nécessaire de mieux caractériser la régulation de l'expression de l'opéron *waaWVL* chez les bactéries AIEC en conditions gastro-intestinales. Par exemple, nous avons observé une activation *in vitro* de la voie  $\sigma^E$  lors du processus d'adhésion des bactéries AIEC, et il serait très intéressant d'étudier si une telle activation est également observée *in vivo* lors de la colonisation de la muqueuse intestinale par les bactéries AIEC.

De plus, nos travaux montrant que la formation de biofilm est potentiellement une étape très importante de la colonisation de la muqueuse intestinale, il serait très intéressant d'étudier si un *quorum sensing* existe au niveau des bactéries AIEC organisées en biofilm, ainsi que le rôle joué par ce dernier. En effet, ce mécanisme permet une régulation coordonnée de l'expression de certains gènes bactériens au sein d'une même population



bactérienne via la production de signaux moléculaires appelés « auto-inducteurs ». Il est désormais bien décrit que le processus de *quorum sensing* joue un rôle important dans l'établissement de biofilm par de nombreuses espèces bactériennes, telle que *Streptococcus pneumoniae* (Vidal *et al.*, 2011), *Listeria monocytogenes* (Riedel *et al.*, 2009), *Vibrio cholerae* (Waters *et al.*, 2008), *E. coli* et *Salmonella enterica* (Ahmer, 2004; Surette *et al.*, 1999). Ainsi, le *quorum sensing* pourrait également jouer un rôle important dans la formation de biofilm par les souches AIEC. Dans ce but, il pourrait être envisagé d'analyser le rôle joué par des acteurs clés du *quorum sensing*, tel que LuxS et QseC, dans la virulence de la souche AIEC de référence LF82. De telles études pourraient s'avérer très prometteuses pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques qui viseraient inhiber le *quorum sensing* bactérien et de ce fait la formation de biofilm (Sintim *et al.*, 2010). Une telle stratégie existe pour inhiber la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa*, en utilisant par exemple du p-bromophenyl-acylhomoserine lactone (Geske *et al.*, 2005).

## 2- Bactéries AIEC et lésions précoces de la maladie de Crohn

Depuis la description du pathovar AIEC en 1999 (Boudeau *et al.*, 1999), de nombreuses études indépendantes ont rapporté une présence anormalement élevée de tels *E. coli* associés à la muqueuse intestinale chez les patients atteints de MC (Baumgart *et al.*, 2007; Conte *et al.*, 2006; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Kotlowski *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2004; Martinez-Medina *et al.*, 2009a; Neut *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2007; Swidsinski *et al.*, 2002). Néanmoins, l'hypothèse d'une implication causale de ces AIEC dans la maladie de Crohn n'est pour l'heure pas prouvée, même si les essais animaux d'infection à AIEC dans le modèle murin CEABAC10 exprimant le récepteur CEACAM6 humain indiquent que les AIEC peuvent être responsables de colites chez un hôte prédisposé (Carvalho *et al.*, 2009). Toutefois, il peut également être envisagé que, chez les patients atteints de MC, la forte prévalence de souches AIEC soit une conséquence de l'activité de la maladie, un contexte inflammatoire pouvant par exemple être à l'origine d'une dysbiose et favoriser la présence de certaines bactéries au détriment d'autres populations (Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2011; Joossens *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2010).

Les lésions les plus précoces observées lors de la MC seraient des ulcérations aphtoides, conséquence d'une nécrose des cellules M localisées au niveau des plaques de



Peyer (Fujimura *et al.*, 1996; Gullberg and Soderholm, 2006; Morson, 1972). Ces cellules M, ayant une forte capacité de transcytose, sont également une cible de choix pour de nombreuses bactéries pathogènes voulant accéder à la lamina propria (Kuolee and Chen, 2008; Neutra *et al.*, 1996a).

### **- AIEC et ciblage des plaques de Peyer**

L'implication des souches de *E. coli* observées chez les patients atteints de MC dans l'apparition des phases précoces de la maladie n'était jusqu'à présent pas étudiée, et il m'a ainsi été confié d'étudier la capacité des AIEC à cibler les plaques de Peyer, et d'identifier les facteurs impliqués dans ce processus. Notre travail s'est basé sur une étude récente qui avait montré que la glycoprotéine GP2, spécifiquement exprimée à la surface des cellules M, permet la fixation d'entérobactéries commensales et pathogènes, tels que *Salmonella enterica* serovar Typhimurium et *Escherichia coli* (Hase *et al.*, 2009). Ce mécanisme d'interaction avec les cellules M implique l'adhésine FimH, composant des pili de type 1 bactérien, et aboutit à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative avec une synthèse d'IgA et d'IgG. L'étude de l'interaction de la souche AIEC LF82 avec l'épithélium associé aux plaques de Peyer murines nous a permis de montrer que cette interaction dépend en partie de l'expression des pili de type 1 et de la présence de la glycoprotéine GP2. Cependant, suite au blocage de l'interaction GP2-FimH, une interaction résiduelle non négligeable de la souche LF82 avec l'épithélium associé aux plaques de Peyer est toujours observée, indiquant qu'un autre mécanisme semble être mis en jeu.

### **- Implication des *long polar fimbriae* dans le ciblage des plaques de Peyer et des cellules M**

Un criblage du génome de la souche AIEC de référence LF82 a alors été réalisé et a montré la présence d'un opéron *lpf*, codant les *long polar fimbriae* (Miquel *et al.*, 2010), et impliqué dans le ciblage des plaques de Peyer par *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Baumler *et al.*, 1996a). La recherche de l'opéron *lpf* a permis de montrer qu'il était présent avec une plus forte prévalence chez les patients atteints de MC comparativement aux patients contrôles. De plus, chez la souche AIEC LF82, nous avons pu montrer que les LPF sont





essentiels pour l'interaction des bactéries AIEC avec les plaques de Peyer murines ou humaines. L'analyse au niveau cellulaire de cette interaction AIEC-plaques de Peyer a montré, grâce à l'utilisation de modèles *in vitro* et *in vivo*, que les LPF sont impliqués dans le ciblage spécifique des cellules M à la surface de l'épithélium des plaques de Peyer.

De manière intéressante, nous avons également montré dans cette étude l'existence d'une potentielle coévolution entre les bactéries AIEC et l'hôte développant une maladie de Crohn. En effet, il a été rapporté une augmentation du nombre de cellules M suite à l'inactivation du récepteur intracytoplasmique NOD2 (Barreau *et al.*, 2007), qui est chez l'homme le principal facteur de susceptibilité génétique associé à la maladie de Crohn (Hugot *et al.*, 2001). Dans notre étude, nous avons pu montrer qu'une telle augmentation du nombre de cellules M à la surface des plaques de Peyer permettait un ciblage et une interaction augmentée de la souche AIEC LF82. Ainsi, les bactéries AIEC exprimant les *long polar fimbriae* pourraient avoir une virulence potentiellement augmentée chez un hôte génétiquement prédisposé.

#### **- Perspectives concernant l'implication des *long polar fimbriae* dans la virulence de la souche AIEC LF82**

Cette étude soulève tout d'abord la question de l'implication potentielle d'autres bactéries pathogènes exprimant des LPF dans la pathogenèse de la maladie de Crohn. Cette idée est confortée par l'observation montrant que certaines infections gastro-intestinales pourraient jouer un rôle dans la survenue et dans l'initiation des MICI, montrant que des gastroentérites causées par des souches de *Salmonella* non-typhoïdes ou par des souches de *Campylobacter* augmentent le risque de développement de MICI (Gradel *et al.*, 2009; Porter *et al.*, 2008). Ces données montrent l'importance de réaliser de nouvelles études épidémiologiques dans le but de rechercher des bactéries pathogènes, notamment entéro-invasives, et exprimant les LPF, au niveau des biopsies de patients atteints de maladie de Crohn iléale.

Suite à ce travail, et dans le but de confirmer l'importance du ciblage des plaques de Peyer par les bactéries AIEC dans l'apparition de l'inflammation intestinale, il pourrait être envisagé d'utiliser certains modèles animaux caractérisés par une absence de plaques de Peyer



et/ou de follicules lymphoïdes isolés, comme par exemple le modèle murin délété pour le gène codant la lymphotoxine-beta ( $LT-\beta^{-/-}$ ) (Eugster *et al.*, 1996). Des études complémentaires sont également nécessaires dans le but d'étudier quel est le devenir des bactéries AIEC suite au ciblage des plaques de Peyer, ainsi que les conséquences d'un tel processus sur la mise en place d'une réponse immunitaire mucosale. De manière intéressante, l'analyse du génome de la souche AIEC de référence LF82 a révélé la présence du gène *gipA* (*growth in Peyer's patches*), précédemment montré chez *Salmonella enterica* serovar Tiphymurium comme permettant la survie des bactéries au sein des plaques de Peyer (Stanley *et al.*, 2000). Des études préliminaires au laboratoire indiquent qu'un mutant isogénique LF82- $\Delta gipA$  est fortement affecté dans sa capacité de survie *in vivo* au sein des plaques Peyer, mais des études complémentaires sont nécessaires afin d'étudier plus précisément le rôle de ce facteur chez les souches AIEC. De plus, l'étude de la prévalence de *gipA*, ainsi que l'étude de la corrélation entre la présence de l'opéron *lpf* et du gène *gipA* au sein d'une collection de souches AIEC pourraient s'avérer très informatives dans le but de développer des outils de diagnostic.

Concernant l'étude de la mise en place d'une réponse immunitaire induite par le ciblage des plaques de Peyer par les bactéries AIEC, des expérimentations sur des souris axéniques, en collaboration avec le groupe d'Andrew J. Macpherson de l'université de Bern, ont été initiées. Les premières données indiquent que la souche sauvage LF82 induit une forte réponse immunitaire adaptative chez les souris axéniques, avec de fort taux sériques d'IgM et d'IgG. De manière intéressante, cette réponse immunitaire apparaît bien moins importante lorsque les souris axéniques sont infectées par une souche de *E. coli* K-12 non pathogène ou par le mutant isogénique LF82- $\Delta lpfA$ . Ces études vont être poursuivies dans le but de confirmer que le ciblage des plaques de Peyer par les bactéries AIEC est bien à l'origine d'une telle réponse immunitaire, mais aussi dans le but d'identifier le(s) antigène(s) bactérien(s) responsable(s) de la réponse adaptative observée.

L'élaboration d'un modèle animal pouvant permettre de mimer les lésions précoces observées chez les patients atteints de maladie de Crohn est également envisagé. Dans ce but, la création de souris *Nod2<sup>-/-</sup>* exprimant le récepteur CEACAM6 au niveau iléal, sous contrôle d'un promoteur villine, pourrait être pertinent. L'utilisation d'un tel modèle animal, combinant à la fois l'expression du récepteur CEACAM6 nécessaire à la colonisation de la



muqueuse iléale par les bactéries AIEC et l'inactivation du récepteur intracytoplasmique NOD2 connue pour entraîner une augmentation du nombre de plaques de Peyer et du nombre de cellules M, pourrait permettre d'étudier l'importance *in vivo* de l'entrée des bactéries AIEC par les plaques de Peyer via l'expression des *long polar fimbriae*. De plus, plusieurs études ont montré l'importance jouée par le processus autophagique dans le pouvoir de survie intracellulaire des souches AIEC, notamment en modèle de cellules épithéliales intestinales (Brest *et al.*, 2011b; Lapaquette *et al.*, 2009), en modèle de cellules macrophagiques (Lapaquette *et al.*, 2011), et en modèle de cellules dendritiques (Cooney *et al.*, 2010). Il a ainsi été reporté qu'une altération du processus autophagique, comme observé chez les patients atteints de maladie de Crohn, favorise la réplication intracellulaire des bactéries AIEC. Ainsi il serait très intéressant d'étudier le rôle joué par une perturbation du processus autophagique dans la survie des souches AIEC internalisées au sein des plaques de Peyer. Pour cela, on pourrait réaliser des expériences avec la souche LF82 sauvage comparativement au mutant délété du gène *lpfA* dans le modèle murin invalidé pour Atg16-L1 au niveau du tissu épithélial intestinal, obtenu par croisement entre des souris Villin-Cre, et des souris Atg16-L1<sup>flox/flox</sup>.

Une autre perspective concernerait l'identification du récepteur aux LPF exprimé à la surface des cellules M, ce qui pourrait être d'un grand intérêt à visée thérapeutique. D'un point de vue technique, une biotinylation des protéines exprimées à la surface des cellules M, suivie d'une concentration en protéines biotinylées puis séparation sur gel SDS-PAGE et transfert sur membrane de nitrocellulose pourrait être envisagée. L'incubation de la membrane avec des LPF purifiés puis avec un anticorps anti-LPF pourrait révéler des interactions protéines eucaryotes-LPF, et l'analyse en spectrométrie de masse permettrait d'identifier le(s) récepteur(s). Avec l'identification de ce récepteur, l'analyse de l'expression de celui-ci à la surface de cellules M de patients atteints de MC comparativement à des sujets contrôles serait très intéressante.

### **3- Bactéries AIEC et tropisme iléal**

En dernière partie de ce travail, l'analyse de la régulation de l'expression de l'opéron *lpf* nous a permis de mettre en évidence une régulation originale de cet opéron en présence de sels biliaires. Ce facteur environnemental de l'intestin était déjà connu pour jouer un rôle



important dans la virulence de bactéries pathogènes à tropisme intestinal. Ainsi, il a par exemple pu être montré que la présence de sels biliaries augmente l'adhésion de *Shigella* spp. aux cellules HeLa (Pope *et al.*, 1995), et est nécessaire pour la mise en place d'un système de sécrétion de type III fonctionnelle chez *Shigella flexneri* (Olive *et al.*, 2007; Stensrud *et al.*, 2008) et *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Wang *et al.*, 2010).

Chez la souche AIEC de référence LF82, nous avons montré que la présence d'acides biliaries active fortement le promoteur de l'opéron *lpf*, et que de telles conditions de culture augmentent fortement le pouvoir d'interaction de la souche AIEC de référence LF82 avec les plaques de Peyer, ainsi que son pouvoir de translocation à travers une monocouche de cellules M. De tels résultats n'ont pas été observés pour le mutant isogénique LF82- $\Delta$ *lpfA* ne produisant pas de LPF, montrant ainsi que l'action des sels biliaries sur l'interaction de la souche AIEC LF82 avec les plaques de Peyer était dépendante des LPF. Le mécanisme moléculaire à l'origine de l'expression des LPF dépendante de la présence de sels biliaries est envisagé, avec notamment la recherche des séquences consensus de fixation à l'ADN pour de nombreux facteurs de transcription et de régulateurs transcriptionnels connus chez *E. coli*.

L'ensemble de ces données semble pouvoir apporter une explication quant au tropisme iléal observé pour les souches AIEC chez les patients atteints de MC (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). En effet, les sels biliaries libérés au niveau du duodénum par le canal provenant de la vésicule biliaire sont par la suite réabsorbés au niveau de l'iléon terminal, conduisant ainsi à une très faible concentration en acide biliaire au niveau colique (Hofmann, 1999). Ainsi, les acides biliaries retrouvés au niveau iléal, et impliqués dans l'activation de l'expression des LPF chez les bactéries AIEC, pourraient être un facteur environnemental clef pour l'activation de la virulence des bactéries AIEC, ainsi que pour leur tropisme iléal. Il est à noter que plusieurs études ont mis en évidence des modifications de la composition en acide biliaire chez les patients atteints de MC (Lapidus *et al.*, 2006; Marks *et al.*, 1977; Pereira *et al.*, 2003), avec notamment une augmentation de la concentration en ursodeoxycholate (Rutgeerts *et al.*, 1986) et une diminution de la concentration en acide deoxycholic (Lapidus and Einarsson, 1998). L'implication de telles modifications sur la régulation de l'expression des LPF chez les bactéries AIEC nécessiterait d'être étudiée.

Dans le but de mieux comprendre l'importance de la régulation de l'expression des LPF chez les souches AIEC en conditions gastro-intestinales, des expériences de ligation du





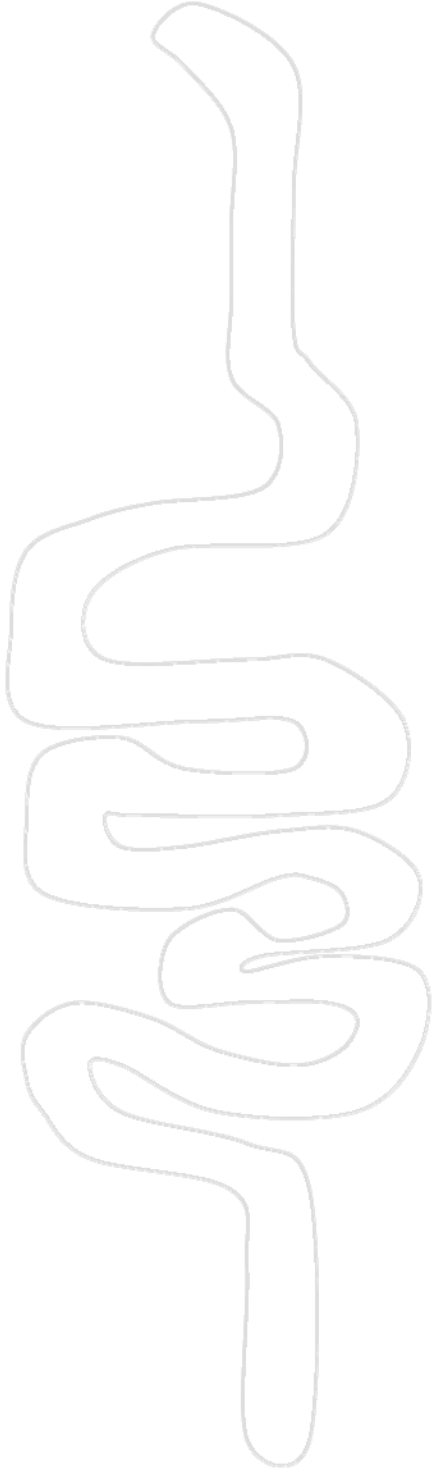
canal biliaire (Huang *et al.*, 2011) pourraient être réalisées dans le modèle animal Villin-*CEACAM6*, *Nod2*<sup>-/-</sup> précédemment décrit. Cette opération chirurgicale conduit à une absence complète de sécrétion biliaire au niveau iléal. Ainsi, suite à l'infection de tels modèles murins par des bactéries AIEC, l'importance de la présence de sels biliaires dans l'expression des LPF et dans la virulence de ces bactéries pourrait être étudiée. Il peut également être envisagé d'utiliser le modèle *Amacr*<sup>-/-</sup>, modèle murin invalidé pour le gène codant l'enzyme *alpha methylacyl coenzyme A racemase* essentielle pour la biosynthèse des acides biliaires (Savolainen *et al.*, 2004). Si ces modèles murins se révèlent concluants, des stratégies thérapeutiques innovantes visant à bloquer l'expression des LPF au niveau iléal pourraient être étudiées. On pourrait, par exemple, utiliser des molécules pouvant bloquer l'assemblage des LPF, comme préconisé pour les pili de type 1 chez les *E. coli* uropathogènes par l'utilisation des pilicides (Hedenstrom *et al.*, 2005; Svensson *et al.*, 2001). Ces molécules très prometteuses agissent en bloquant l'export des protéines fimbriales de l'intérieur de la bactérie à l'extérieur, et l'utilisation de telles molécules bloque toute interaction impliquant les pili de type 1 avec les cellules de l'hôte.

L'ensemble des données obtenues permet d'affiner le mécanisme de colonisation de la muqueuse iléale des patients atteints de maladie de Crohn par les bactéries AIEC. Ce mécanisme est complexe et fait intervenir plusieurs facteurs. L'expression de pili de type 1 variants par les bactéries AIEC permettrait une forte colonisation de l'épithélium iléal grâce à leur liaison au récepteur *CEACAM6* surexprimé chez les patients atteints de maladie de Crohn. Cette colonisation pourrait être renforcée par la formation de biofilms bactériens et l'expression des *long polar fimbriae* permettant aux bactéries AIEC de cibler les plaques de Peyer au niveau iléal. Une telle infection pourrait induire un stade précoce de la maladie de Crohn, sans oublier que les bactéries AIEC intracellulaires auraient également un pouvoir de survie favorisé dans les cellules épithéliales intestinales et les macrophages en contexte d'autophagie déficiente.



*REFERENCES*

*BIBLIOGRAPHIQUES*





- Abe, J., Onimaru, M., Matsumoto, S., Noma, S., Baba, K., Ito, Y., Kohsaka, T., and Takeda, T. (1997) Clinical role for a superantigen in *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *J Clin Invest* **99**: 1823-1830.
- Abraham, C., and Cho, J.H. (2009) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **361**: 2066-2078.
- Abreu, M.T. (2010) Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* **10**: 131-144.
- Adam, T., Arpin, M., Prevost, M.C., Gounon, P., and Sansonetti, P.J. (1995) Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *J Cell Biol* **129**: 367-381.
- Afzal, M.A., Minor, P.D., Begley, J., Bentley, M.L., Armitage, E., Ghosh, S., and Ferguson, A. (1998) Absence of measles-virus genome in inflammatory bowel disease. *Lancet* **351**: 646-647.
- Ahmer, B.M. (2004) Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **52**: 933-945.
- Ambrose, N.S., Johnson, M., Burdon, D.W., and Keighley, M.R. (1984) Incidence of pathogenic bacteria from mesenteric lymph nodes and ileal serosa during Crohn's disease surgery. *Br J Surg* **71**: 623-625.
- Ambrose, N.S., Allan, R.N., Keighley, M.R., Burdon, D.W., Youngs, D., Barnes, P., and Lennard-Jones, J.E. (1985) Antibiotic therapy for treatment in relapse of intestinal Crohn's disease. A prospective randomized study. *Dis Colon Rectum* **28**: 81-85.
- Amer, A.O., Byrne, B.G., and Swanson, M.S. (2005) Macrophages rapidly transfer pathogens from lipid raft vacuoles to autophagosomes. *Autophagy* **1**: 53-58.
- Amer, A.O., and Swanson, M.S. (2005) Autophagy is an immediate macrophage response to *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* **7**: 765-778.
- Andoh, A., Sakata, S., Koizumi, Y., Mitsuyama, K., Fujiyama, Y., and Benno, Y. (2007) Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the diversity of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* **13**: 955-962.
- Andrianifahanana, M., Moniaux, N., and Batra, S.K. (2006) Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta* **1765**: 189-222.
- Arnold, G.L., Beaves, M.R., Pryjdu, V.O., and Mook, W.J. (2002) Preliminary study of ciprofloxacin in active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **8**: 10-15.
- Arnott, I.D., Nimmo, E.R., Drummond, H.E., Fennell, J., Smith, B.R., MacKinlay, E., Morecroft, J., Anderson, N., Kelleher, D., O'Sullivan, M., McManus, R., and Satsangi, J. (2004) NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun* **5**: 417-425.
- Autschbach, F., Eisold, S., Hinz, U., Zinser, S., Linnebacher, M., Giese, T., Loffler, T., Buchler, M.W., and Schmidt, J. (2005) High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies Paratuberculosis IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut* **54**: 944-949.
- Averboukh, F., Ziv, Y., Kariv, Y., Zmora, O., Dotan, I., Klausner, J.M., Rabau, M., and Tulchinsky, H. (2011) Colorectal carcinoma in inflammatory bowel disease - A comparison between Crohn's and ulcerative colitis. *Colorectal Dis*.
- Awaad, A., Nakamura, M., and Ishimura, K. (2011) Imaging of Size-dependent Uptake and Identification of Novel Pathway in Mouse Peyer's Patches Using Fluorescent Organosilica Particles. *Nanomedicine*.
- Baert, F., Noman, M., Vermeire, S., Van Assche, G., G, D.H., Carbonez, A., and Rutgeerts, P. (2003) Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* **348**: 601-608.



- Barnes, M.J., and Powrie, F. (2009) Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity* **31**: 401-411.
- Barnich, N., Boudeau, J., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2003) Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol Microbiol* **48**: 781-794.
- Barnich, N., Carvalho, F.A., Glasser, A.L., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., Peeters, H., Bommelaer, G., Desreumaux, P., Colombel, J.F., and Darfeuille-Michaud, A. (2007) CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* **117**: 1566-1574.
- Barreau, F., Meinzer, U., Chareyre, F., Berrebi, D., Niwa-Kawakita, M., Dussailant, M., Foligne, B., Ollendorff, V., Heyman, M., Bonacorsi, S., Lesuffleur, T., Sterkers, G., Giovannini, M., and Hugot, J.P. (2007) CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *PLoS ONE* **2**: e523.
- Barreau, F., Madre, C., Meinzer, U., Berrebi, D., Dussailant, M., Merlin, F., Eckmann, L., Karin, M., Sterkers, G., Bonacorsi, S., Lesuffleur, T., and Hugot, J.P. (2010) Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches. *Gut* **59**: 207-217.
- Barrett, J.C., Hansoul, S., Nicolae, D.L., Cho, J.H., Duerr, R.H., Rioux, J.D., Brant, S.R., Silverberg, M.S., Taylor, K.D., Barmada, M.M., Bitton, A., Dassopoulos, T., Datta, L.W., Green, T., Griffiths, A.M., Kistner, E.O., Murtha, M.T., Regueiro, M.D., Rotter, J.I., Schumm, L.P., Steinhart, A.H., Targan, S.R., Xavier, R.J., Libioulle, C., Sandor, C., Lathrop, M., Belaiche, J., Dewit, O., Gut, I., Heath, S., Laukens, D., Mni, M., Rutgeerts, P., Van Gossum, A., Zelenika, D., Franchimont, D., Hugot, J.P., de Vos, M., Vermeire, S., Louis, E., Cardon, L.R., Anderson, C.A., Drummond, H., Nimmo, E., Ahmad, T., Prescott, N.J., Onnie, C.M., Fisher, S.A., Marchini, J., Ghori, J., Bumpstead, S., Gwilliam, R., Tremelling, M., Deloukas, P., Mansfield, J., Jewell, D., Satsangi, J., Mathew, C.G., Parkes, M., Georges, M., and Daly, M.J. (2008) Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* **40**: 955-962.
- Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281-297.
- Basle, A., Rummel, G., Storici, P., Rosenbusch, J.P., and Schirmer, T. (2006) Crystal structure of osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å. *J Mol Biol* **362**: 933-942.
- Baumgart, D.C., and Sandborn, W.J. (2007) Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* **369**: 1641-1657.
- Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., Orsi, R.H., Wiedmann, M., McDonough, P., Kim, S.G., Berg, D., Schukken, Y., Scherl, E., and Simpson, K.W. (2007) Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *Isme J* **1**: 403-418.
- Baumler, A.J., and Heffron, F. (1995) Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium. *J Bacteriol* **177**: 2087-2097.
- Baumler, A.J., Tsois, R.M., and Heffron, F. (1996a) The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella* Typhimurium to murine Peyer's patches. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 279-283.
- Baumler, A.J., Tsois, R.M., and Heffron, F. (1996b) Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella* Typhimurium. *Infect Immun* **64**: 1862-1865.
- Beaven, S.W., and Abreu, M.T. (2004) Biomarkers in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* **20**: 318-327.
- Begue, B., Dumant, C., Bambou, J.C., Beaulieu, J.F., Chamaillard, M., Hugot, J.P., Goulet, O., Schmitz, J., Philpott, D.J., Cerf-Bensussan, N., and Ruemmele, F.M. (2006) Microbial induction of CARD15





- expression in intestinal epithelial cells via toll-like receptor 5 triggers an antibacterial response loop. *J Cell Physiol* **209**: 241-252.
- Beloin, C., Michaelis, K., Lindner, K., Landini, P., Hacker, J., Ghigo, J.M., and Dobrindt, U. (2006) The transcriptional antiterminator RfaH represses biofilm formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 1316-1331.
- Bernardini, M.L., Fontaine, A., and Sansonetti, P.J. (1990) The two-component regulatory system ompR-envZ controls the virulence of *Shigella flexneri*. *J Bacteriol* **172**: 6274-6281.
- Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C.M., Beard, S.E., and Schneider, J. (1999) Bile salt activation of stress response promoters in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* **39**: 68-72.
- Beveridge, T.J. (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* **181**: 4725-4733.
- Binder, V., and Orholm, M. (1996) Familial occurrence and inheritance studies in inflammatory bowel disease. *Neth J Med* **48**: 53-56.
- Binder, V. (2004) Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**: 463-479.
- Birrenbach, T., and Bocker, U. (2004) Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis* **10**: 848-859.
- Bjorksten, B. (2009) Disease outcomes as a consequence of environmental influences on the development of the immune system. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **9**: 185-189.
- Blichfeldt, P., Blomhoff, J.P., Myhre, E., and Gjone, E. (1978) Metronidazole in Crohn's disease. A double blind cross-over clinical trial. *Scand J Gastroenterol* **13**: 123-127.
- Borody, T.J., Leis, S., Warren, E.F., and Surace, R. (2002) Treatment of severe Crohn's disease using antimycobacterial triple therapy--approaching a cure? *Dig Liver Dis* **34**: 29-38.
- Borody, T.J., Bilkey, S., Wettstein, A.R., Leis, S., Pang, G., and Tye, S. (2007) Anti-mycobacterial therapy in Crohn's disease heals mucosa with longitudinal scars. *Dig Liver Dis* **39**: 438-444.
- Borsutzky, S., Cazac, B.B., Roes, J., and Guzman, C.A. (2004) TGF-beta receptor signaling is critical for mucosal IgA responses. *J Immunol* **173**: 3305-3309.
- Borzutzky, A., Fried, A., Chou, J., Bonilla, F.A., Kim, S., and Dedeoglu, F. (2010) NOD2-associated diseases: Bridging innate immunity and autoinflammation. *Clin Immunol* **134**: 251-261.
- Bossuyt, X. (2006) Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin Chem* **52**: 171-181.
- Boudeau, J., Glasser, A.L., Masseret, E., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A. (1999) Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* **67**: 4499-4509.
- Boudeau, J., Barnich, N., and Darfeuille-Michaud, A. (2001) Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol Microbiol* **39**: 1272-1284.
- Bouma, G., and Strober, W. (2003) The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* **3**: 521-533.
- Bower, J.M., Eto, D.S., and Mulvey, M.A. (2005) Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic* **6**: 18-31.



- Brand, S., Staudinger, T., Schnitzler, F., Pfennig, S., Hofbauer, K., Dambacher, J., Seiderer, J., Tillack, C., Konrad, A., Crispin, A., Goke, B., Lohse, P., and Ochsenkuhn, T. (2005) The role of Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and CARD15/NOD2 mutations in the susceptibility and phenotype of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **11**: 645-652.
- Braun, A., Treede, I., Gotthardt, D., Tietje, A., Zahn, A., Ruhwald, R., Schoenfeld, U., Welsch, T., Kienle, P., Erben, G., Lehmann, W.D., Fuellekrug, J., Stremmel, W., and Ehehalt, R. (2009) Alterations of phospholipid concentration and species composition of the intestinal mucus barrier in ulcerative colitis: a clue to pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis* **15**: 1705-1720.
- Breese, E.J., Michie, C.A., Nicholls, S.W., Murch, S.H., Williams, C.B., Domizio, P., Walker-Smith, J.A., and MacDonald, T.T. (1994) Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **106**: 1455-1466.
- Brest, P., Corcelle, E.A., Cesaro, A., Chargui, A., Belaid, A., Klionsky, D.J., Vouret-Craviari, V., Hebuterne, X., Hofman, P., and Mograbi, B. (2010) Autophagy and Crohn's disease: at the crossroads of infection, inflammation, immunity, and cancer. *Curr Mol Med* **10**: 486-502.
- Brest, P., Lapaquette, P., Mograbi, B., Darfeuille-Michaud, A., and Hofman, P. (2011a) Risk predisposition for Crohn disease: a "menage a trois" combining IRGM allele, miRNA and xenophagy. *Autophagy* **7**: 786-787.
- Brest, P., Lapaquette, P., Souidi, M., Lebrigand, K., Cesaro, A., Vouret-Craviari, V., Mari, B., Barbry, P., Mosnier, J.F., Hebuterne, X., Harel-Bellan, A., Mograbi, B., Darfeuille-Michaud, A., and Hofman, P. (2011b) 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* **43**: 242-245.
- Bringer, M.A., Barnich, N., Glasser, A.L., Bardot, O., and Darfeuille-Michaud, A. (2005) HtrA stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent and invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* **73**: 712-721.
- Bringer, M.A., Glasser, A.L., Tung, C.H., Meresse, S., and Darfeuille-Michaud, A. (2006) The Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. *Cell Microbiol* **8**: 471-484.
- Bringer, M.A., Rolhion, N., Glasser, A.L., and Darfeuille-Michaud, A. (2007) The oxidoreductase DsbA plays a key role in the ability of the Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 to resist macrophage killing. *J Bacteriol* **189**: 4860-4871.
- Bringer, M.A., Billard, E., Glasser, A.L., Colombel, J.F., and Darfeuille-Michaud, A. (2011) Replication of Crohn's disease-associated AIEC within macrophages is dependent on TNF-alpha secretion. *Lab Invest* **Accepted**.
- Bulet, P., Stocklin, R., and Menin, L. (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* **198**: 169-184.
- Burich, A., Hershberg, R., Waggle, K., Zeng, W., Brabb, T., Westrich, G., Viney, J.L., and Maggio-Price, L. (2001) *Helicobacter*-induced inflammatory bowel disease in IL-10- and T cell-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**: G764-778.
- Burke, D.A., and Axon, A.T. (1988) Adhesive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea. *Bmj* **297**: 102-104.
- Cadiot, G., Galmiche, J.P., Matuchansky, C., and Mignon, M. (2005) Gastro-entérologie, nouvelle éditions. *Agence universitaire de la francophonie, ELLIPSES / AUF*.
- Cadwell, K., Liu, J.Y., Brown, S.L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J.K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J.A., Hunt, S., Stone, C.D., Brunt, E.M., Xavier, R.J., Sleckman, B.P., Li, E., Mizushima, N., Stappenbeck, T.S., and Virgin, H.W.t. (2008) A key role for autophagy and the autophagy gene *Atg16l1* in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* **456**: 259-263.



- Cadwell, K., Patel, K.K., Maloney, N.S., Liu, T.C., Ng, A.C., Storer, C.E., Head, R.D., Xavier, R., Stappenbeck, T.S., and Virgin, H.W. (2010) Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell* **141**: 1135-1145.
- Cani, P.D., and Delzenne, N.M. (2009) The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des* **15**: 1546-1558.
- Caprilli, R., Lapaquette, P., and Darfeuille-Michaud, A. (2010) Eating the enemy in Crohn's disease: an old theory revisited. *J Crohns Colitis* **4**: 377-383.
- Cario, E., and Podolsky, D.K. (2000) Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* **68**: 7010-7017.
- Cario, E. (2005) Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* **54**: 1182-1193.
- Cartun, R.W., Van Kruiningen, H.J., Pedersen, C.A., and Berman, M.M. (1993) An immunocytochemical search for infectious agents in Crohn's disease. *Mod Pathol* **6**: 212-219.
- Carvalho, F.A., Barnich, N., Sivignon, A., Darcha, C., Chan, C.H., Stanners, C.P., and Darfeuille-Michaud, A. (2009) Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med* **206**: 2179-2189.
- Cazac, B.B., and Roes, J. (2000) TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA *in vivo*. *Immunity* **13**: 443-451.
- Cerf-Bensussan, N. (2005) Système lymphoïde associé à l'intestin. Rôle en situation normale et au cours de l'inflammation. *Traité de gastro-entérologie, 2ème édition, Paris : Médecine Sciences Flammarion*: 55-73.
- Charrier, L., and Merlin, D. (2006) The oligopeptide transporter hPepT1: gateway to the innate immune response. *Lab Invest* **86**: 538-546.
- Chassaing, B., and Darfeuille-Michaud, A. (2011) The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **140**: 1720-1728 e1723.
- Che, N., Li, S., Gao, T., Zhang, Z., Han, Y., Zhang, X., Sun, Y., Liu, Y., Sun, Z., Zhang, J., Ren, W., Tian, M., Li, Y., Li, W., Cheng, J., and Li, C. (2010) Identification of a novel *IRGM* promoter single nucleotide polymorphism associated with tuberculosis. *Clin Chim Acta* **411**: 1645-1649.
- Chen, W., Li, D., Paulus, B., Wilson, I., and Chadwick, V.S. (2000) Detection of *Listeria monocytogenes* by polymerase chain reaction in intestinal mucosal biopsies from patients with inflammatory bowel disease and controls. *J Gastroenterol Hepatol* **15**: 1145-1150.
- Cheroutre, H. (2004) Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annu Rev Immunol* **22**: 217-246.
- Chiba, M., Fukushima, T., Inoue, S., Horie, Y., Iizuka, M., and Masamune, O. (1998a) *Listeria monocytogenes* in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* **33**: 430-434.
- Chiba, M., Komatsu, M., Iizuka, M., Masamune, O., Hoshina, S., and Kono, M. (1998b) Microbiology of the intestinal lymph follicle: a clue to elucidate causative microbial agent(s) in Crohn's disease. *Med Hypotheses* **51**: 421-427.
- Chin, E.Y., Dangler, C.A., Fox, J.G., and Schauer, D.B. (2000) *Helicobacter hepaticus* infection triggers inflammatory bowel disease in T cell receptor alphabeta mutant mice. *Comp Med* **50**: 586-594.
- Chiodini, R.J. (1989) Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin Microbiol Rev* **2**: 90-117.



- Cho, J.H., and Brant, S.R. (2011) Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **140**: 1704-1712 e1702.
- Ciornei, C.D., Novikov, A., Beloin, C., Fitting, C., Caroff, M., Ghigo, J.M., Cavaillon, J.M., and Adib-Conquy, M. (2010) Biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* bacteria undergo lipopolysaccharide structural modifications and induce enhanced inflammatory cytokine response in human monocytes. *Innate Immun* **16**: 288-301.
- Claret, L., Miquel, S., Vieille, N., Ryjenkov, D.A., Gomelsky, M., and Darfeuille-Michaud, A. (2007) The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *J Biol Chem* **282**: 33275-33283.
- Clark, M.A., Hirst, B.H., and Jepson, M.A. (1998) M-cell surface beta1 integrin expression and invasion-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun* **66**: 1237-1243.
- Clarke, D.J., Chaudhuri, R.R., Martin, H.M., Campbell, B.J., Rhodes, J.M., Constantinidou, C., Pallen, M.J., Loman, N.J., Cunningham, A.F., Browning, D.F., and Henderson, I.R. (2011) Complete Genome Sequence of the Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Strain HM605. *J Bacteriol* **193**: 4540.
- Colgan, J., and Rothman, P. (2006) All in the family: IL-27 suppression of T(H)-17 cells. *Nat Immunol* **7**: 899-901.
- Collado, M.C., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., and Sanz, Y. (2009) Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J Clin Pathol* **62**: 264-269.
- Colombel, J.F., and Hugot, J.P. (1996) [Genetics of Crohn disease: a complex model]. *Gastroenterol Clin Biol* **20**: B15-20.
- Colombel, J.F., Lemann, M., Cassagnou, M., Bouhnik, Y., Duclos, B., Dupas, J.L., Notteghem, B., and Mary, J.Y. (1999) A controlled trial comparing ciprofloxacin with mesalazine for the treatment of active Crohn's disease. Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives (GETAID). *Am J Gastroenterol* **94**: 674-678.
- Colombel, J.F., Cortot, A., and van Kruiningen, H.J. (2001) Antibiotics in Crohn's disease. *Gut* **48**: 647.
- Colombel, J.F., Sandborn, W.J., Reinisch, W., Mantzaris, G.J., Kornbluth, A., Rachmilewitz, D., Lichtiger, S., D'Haens, G., Diamond, R.H., Broussard, D.L., Tang, K.L., van der Woude, C.J., and Rutgeerts, P. (2010) Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* **362**: 1383-1395.
- Cong, Y., Brandwein, S.L., McCabe, R.P., Lazenby, A., Birkenmeier, E.H., Sundberg, J.P., and Elson, C.O. (1998) CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *J Exp Med* **187**: 855-864.
- Conte, M.P., Schippa, S., Zamboni, I., Penta, M., Chiarini, F., Seganti, L., Osborn, J., Falconieri, P., Borrelli, O., and Cucchiara, S. (2006) Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **55**: 1760-1767.
- Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P., Ferguson, D.J., Campbell, B.J., Jewell, D., and Simmons, A. (2010) NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* **16**: 90-97.
- Cosnes, J. (2004) Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**: 481-496.
- Cottone, M., Rosselli, M., Orlando, A., Oliva, L., Puleo, A., Cappello, M., Traina, M., Tonelli, F., and Pagliaro, L. (1994) Smoking habits and recurrence in Crohn's disease. *Gastroenterology* **106**: 643-648.





- Cottone, M., Orlando, A., and Renna, S. (2010) Investigational agents for Crohn's disease. *Expert Opin Investig Drugs* **19**: 1147-1159.
- Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R.A., Jansonius, J.N., and Rosenbusch, J.P. (1992) Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**: 727-733.
- Crawford, P.A., Crowley, J.R., Sambandam, N., Muegge, B.D., Costello, E.K., Hamady, M., Knight, R., and Gordon, J.I. (2009) Regulation of myocardial ketone body metabolism by the gut microbiota during nutrient deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 11276-11281.
- Crohn, B.B., Ginzburg, L., and Oppenheimer, G.D. (2000) Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. *Mt Sinai J Med* **67**: 263-268.
- Crotty, S., Miller, C.J., Lohman, B.L., Neagu, M.R., Compton, L., Lu, D., Lu, F.X., Fritts, L., Lifson, J.D., and Andino, R. (2001) Protection against simian immunodeficiency virus vaginal challenge by using Sabin poliovirus vectors. *J Virol* **75**: 7435-7452.
- Cryz, S.J., Jr., Vanprapar, N., Thisyakorn, U., Olanratmanee, T., Losonsky, G., Levine, M.M., and Chearskul, S. (1993) Safety and immunogenicity of *Salmonella typhi* Ty21a vaccine in young Thai children. *Infect Immun* **61**: 1149-1151.
- Dalmaso, G., Nguyen, H.T., Charrier-Hisamuddin, L., Yan, Y., Laroui, H., Demoulin, B., Sitaraman, S.V., and Merlin, D. (2010) PepT1 mediates transport of the proinflammatory bacterial tripeptide L-Ala- $\{\gamma\}$ -D-Glu-meso-DAP in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**: G687-696.
- Dalmaso, G., Nguyen, H.T., Ingersoll, S.A., Ayyadurai, S., Laroui, H., Charania, M.A., Yan, Y., Sitaraman, S.V., and Merlin, D. (2011) The PepT1-NOD2 Signaling Pathway Aggravates Induced Colitis in Mice. *Gastroenterology*.
- Dalziel, T.K. (1989) Thomas Kennedy Dalziel 1861-1924. Chronic interstitial enteritis. *Dis Colon Rectum* **32**: 1076-1078.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., and Colombel, J.F. (1998) Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **115**: 1405-1413.
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.L., Barnich, N., Bringer, M.A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J.F. (2004) High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* **127**: 412-421.
- Daszak, P., Purcell, M., Lewin, J., Dhillon, A.P., Pounder, R.E., and Wakefield, A.J. (1997) Detection and comparative analysis of persistent measles virus infection in Crohn's disease by immunogold electron microscopy. *J Clin Pathol* **50**: 299-304.
- De Las Penas, A., Connolly, L., and Gross, C.A. (1997) The sigmaE-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of sigmaE. *Mol Microbiol* **24**: 373-385.
- Declercq, C., Gower-Rousseau, C., Vernier-Massouille, G., Salleron, J., Balde, M., Poirier, G., Lerebours, E., Dupas, J.L., Merle, V., Marti, R., Duhamel, A., Cortot, A., Salomez, J.L., and Colombel, J.F. (2010) Mapping of inflammatory bowel disease in northern France: spatial variations and relation to affluence. *Inflamm Bowel Dis* **16**: 807-812.
- Denizot, J., Sivignon, A., Barreau, F., Darcha, C., Chan, H.F., Stanners, C.P., Hofman, P., Darfeuille-Michaud, A., and Barnich, N. (2011) Adherent-invasive *Escherichia coli* induce claudin-2 expression and barrier defect in CEABAC10 mice and crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis*.
- Deretic, V. (2005) Autophagy in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* **26**: 523-528.



- Desreumaux, P., Brandt, E., Gambiez, L., Emilie, D., Geboes, K., Klein, O., Ectors, N., Cortot, A., Capron, M., and Colombel, J.F. (1997) Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. *Gastroenterology* **113**: 118-126.
- Dessein, R., Peyrin-Biroulet, L., and Chamaillard, M. (2009) Intestinal microbiota gives a nod to the hygiene hypothesis in type 1 diabetes. *Gastroenterology* **137**: 381-383.
- D'Haens, G., Van Deventer, S., Van Hogezaand, R., Chalmers, D., Kothe, C., Baert, F., Braakman, T., Schaible, T., Geboes, K., and Rutgeerts, P. (1999) Endoscopic and histological healing with infliximab anti-tumor necrosis factor antibodies in Crohn's disease: A European multicenter trial. *Gastroenterology* **116**: 1029-1034.
- D'Haens, G.R., Geboes, K., Peeters, M., Baert, F., Penninckx, F., and Rutgeerts, P. (1998) Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* **114**: 262-267.
- Dianda, L., Hanby, A.M., Wright, N.A., Sebesteny, A., Hayday, A.C., and Owen, M.J. (1997) T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment. *Am J Pathol* **150**: 91-97.
- Dibb-Fuller, M.P., Allen-Vercoe, E., Thorns, C.J., and Woodward, M.J. (1999) Fimbriae- and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by *Salmonella enteritidis*. *Microbiology* **145** (Pt 5): 1023-1031.
- Dickinson, R.J., Varian, S.A., Axon, A.T., and Cooke, E.M. (1980) Increased incidence of faecal coliforms with *in vitro* adhesive and invasive properties in patients with ulcerative colitis. *Gut* **21**: 787-792.
- Dolg, P., Yao, R., Burr, D.H., Guerry, P., and Trust, T.J. (1996) An environmentally regulated pilus-like appendage involved in *Campylobacter* pathogenesis. *Mol Microbiol* **20**: 885-894.
- Dryden, G.W., Jr. (2009) Overview of biologic therapy for Crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther* **9**: 967-974.
- Du, H., Sheng, X., Zhang, H., Zou, X., Ni, B., Xu, S., Zhu, X., Xu, H., and Huang, X. (2011) RpoE may promote flagellar gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhi under hyperosmotic stress. *Curr Microbiol* **62**: 492-500.
- Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., Dassopoulos, T., Bitton, A., Yang, H., Targan, S., Datta, L.W., Kistner, E.O., Schumm, L.P., Lee, A.T., Gregersen, P.K., Barmada, M.M., Rotter, J.I., Nicolae, D.L., and Cho, J.H. (2006) A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314**: 1461-1463.
- Dutta, S., Iida, K., Takade, A., Meno, Y., Nair, G.B., and Yoshida, S. (2004) Release of Shiga toxin by membrane vesicles in *Shigella dysenteriae* serotype 1 strains and *in vitro* effects of antimicrobials on toxin production and release. *Microbiol Immunol* **48**: 965-969.
- Economou, M., Filis, G., Tsianou, Z., Alamanos, J., Kogevinas, A., Masalas, K., Petrou, A., and Tsianos, E.V. (2007) Crohn's disease incidence evolution in North-western Greece is not associated with alteration of NOD2/CARD15 variants. *World J Gastroenterol* **13**: 5116-5120.
- Ellingson, J.L., Cheville, J.C., Brees, D., Miller, J.M., and Cheville, N.F. (2003) Absence of *Mycobacterium avium* subspecies Paratuberculosis components from Crohn's disease intestinal biopsy tissues. *Clin Med Res* **1**: 217-226.
- Ellis, R.D., Goodlad, J.R., Limb, G.A., Powell, J.J., Thompson, R.P., and Pouchard, N.A. (1998) Activation of nuclear factor kappa B in Crohn's disease. *Inflamm Res* **47**: 440-445.
- Elson, C.O., Cong, Y., McCracken, V.J., Dimmitt, R.A., Lorenz, R.G., and Weaver, C.T. (2005) Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev* **206**: 260-276.



- Eskelinen, E.L. (2005) Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* **1**: 1-10.
- Eugster, H.P., Muller, M., Karrer, U., Car, B.D., Schnyder, B., Eng, V.M., Woerly, G., Le Hir, M., di Padova, F., Aguët, M., Zinkernagel, R., Bluethmann, H., and Ryffel, B. (1996) Multiple immune abnormalities in tumor necrosis factor and lymphotoxin- $\alpha$  double-deficient mice. *Int Immunol* **8**: 23-36.
- Falk, R.J., and Jennette, J.C. (1988) Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* **318**: 1651-1657.
- Farrokhyar, F., Swarbrick, E.T., and Irvine, E.J. (2001) A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* **36**: 2-15.
- Fasseu, M., Treton, X., Guichard, C., Pedruzzi, E., Cazals-Hatem, D., Richard, C., Aparicio, T., Daniel, F., Soule, J.C., Moreau, R., Bouhnik, Y., Laburthe, M., Groyer, A., and Ogier-Denis, E. (2010) Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One* **5**.
- Feller, M., Huwiler, K., Stephan, R., Altpeter, E., Shang, A., Furrer, H., Pfyffer, G.E., Jemmi, T., Baumgartner, A., and Egger, M. (2007) *Mycobacterium avium* subspecies Paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **7**: 607-613.
- Feller, M., Huwiler, K., Schoepfer, A., Shang, A., Furrer, H., and Egger, M. (2010) Long-term antibiotic treatment for Crohn's disease: systematic review and meta-analysis of placebo-controlled trials. *Clin Infect Dis* **50**: 473-480.
- Fenoglio-Preiser, C.M. (1997) Gastrointestinal pathology. An atlas and text. 2ème édition. New York : Lippincott Raven.
- Finegold, S.M., Attebery, H.R., and Sutter, V.L. (1974) Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. *Am J Clin Nutr* **27**: 1456-1469.
- Finegold, S.M., Molitoris, D., Song, Y., Liu, C., Vaisanen, M.L., Bolte, E., McTeague, M., Sandler, R., Wexler, H., Marlowe, E.M., Collins, M.D., Lawson, P.A., Summanen, P., Baysallar, M., Tomzynski, T.J., Read, E., Johnson, E., Rolfe, R., Nasir, P., Shah, H., Haake, D.A., Manning, P., and Kaul, A. (2002) Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clin Infect Dis* **35**: S6-S16.
- Finlay, B.B., and Falkow, S. (1988) Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella cholerae-suis*, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. *Biochimie* **70**: 1089-1099.
- Fiocca, R., Necchi, V., Sommi, P., Ricci, V., Telford, J., Cover, T.L., and Solcia, E. (1999) Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J Pathol* **188**: 220-226.
- Fleiszig, S.M., Arora, S.K., Van, R., and Ramphal, R. (2001) FlhA, a component of the flagellum assembly apparatus of *Pseudomonas aeruginosa*, plays a role in internalization by corneal epithelial cells. *Infect Immun* **69**: 4931-4937.
- Forcione, D.G., Rosen, M.J., Kisiel, J.B., and Sands, B.E. (2004) Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody (ASCA) positivity is associated with increased risk for early surgery in Crohn's disease. *Gut* **53**: 1117-1122.
- Fowler, E.V., Doecke, J., Simms, L.A., Zhao, Z.Z., Webb, P.M., Hayward, N.K., Whiteman, D.C., Florin, T.H., Montgomery, G.W., Cavanaugh, J.A., and Radford-Smith, G.L. (2008) ATG16L1 T300A shows strong associations with disease subgroups in a large Australian IBD population: further support for significant disease heterogeneity. *Am J Gastroenterol* **103**: 2519-2526.
- Franchimont, D., Vermeire, S., El Housni, H., Pierik, M., Van Steen, K., Gustot, T., Quertinmont, E., Abramowicz, M., Van Gossum, A., Deviere, J., and Rutgeerts, P. (2004) Deficient host-bacteria



- interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* **53**: 987-992.
- Francis, C.L., Ryan, T.A., Jones, B.D., Smith, S.J., and Falkow, S. (1993) Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* **364**: 639-642.
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13780-13785.
- Franks, A.H., Harmsen, H.J., Raangs, G.C., Jansen, G.J., Schut, F., and Welling, G.W. (1998) Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3336-3345.
- Freeman, H., and Noble, M. (2005) Lack of evidence for *Mycobacterium avium* subspecies Paratuberculosis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **11**: 782-783.
- Fujimura, Y., Kamoi, R., and Iida, M. (1996) Pathogenesis of aphthoid ulcers in Crohn's disease: correlative findings by magnifying colonoscopy, electron microscopy, and immunohistochemistry. *Gut* **38**: 724-732.
- Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., and Fujiyama, Y. (2003) Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* **52**: 65-70.
- Fujita, H., Eishi, Y., Ishige, I., Saitoh, K., Takizawa, T., Arima, T., and Koike, M. (2002) Quantitative analysis of bacterial DNA from *Mycobacteria* spp., *Bacteroides vulgatus*, and *Escherichia coli* in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* **37**: 509-516.
- Gankema, H., Wensink, J., Guinee, P.A., Jansen, W.H., and Witholt, B. (1980) Some characteristics of the outer membrane material released by growing enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **29**: 704-713.
- Garrett, W.S., Lord, G.M., Punit, S., Lugo-Villarino, G., Mazmanian, S.K., Ito, S., Glickman, J.N., and Glimcher, L.H. (2007) Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell* **131**: 33-45.
- Gassler, N., Rohr, C., Schneider, A., Kartenbeck, J., Bach, A., Obermuller, N., Otto, H.F., and Autschbach, F. (2001) Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**: G216-228.
- Gent, A.E., Hellier, M.D., Grace, R.H., Swarbrick, E.T., and Coggon, D. (1994) Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* **343**: 766-767.
- Geske, G.D., Wezeman, R.J., Siegel, A.P., and Blackwell, H.E. (2005) Small molecule inhibitors of bacterial quorum sensing and biofilm formation. *J Am Chem Soc* **127**: 12762-12763.
- Giaffer, M.H., Holdsworth, C.D., and Duerden, B.I. (1991) The assessment of faecal flora in patients with inflammatory bowel disease by a simplified bacteriological technique. *J Med Microbiol* **35**: 238-243.
- Giaffer, M.H., Holdsworth, C.D., and Duerden, B.I. (1992) Virulence properties of *Escherichia coli* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **33**: 646-650.
- Giampapa, C.S., Abraham, S.N., Chiang, T.M., and Beachey, E.H. (1988) Isolation and characterization of a receptor for type 1 fimbriae of *Escherichia coli* from guinea pig erythrocytes. *J Biol Chem* **263**: 5362-5367.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., and Sansonetti, P.J. (2003a) Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **278**: 8869-8872.





- Girardin, S.E., Travassos, L.H., Herve, M., Blanot, D., Boneca, I.G., Philpott, D.J., Sansonetti, P.J., and Mengin-Lecreulx, D. (2003b) Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem* **278**: 41702-41708.
- Giron, J.A., Torres, A.G., Freer, E., and Kaper, J.B. (2002) The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol* **44**: 361-379.
- Glasser, A.L., Boudeau, J., Barnich, N., Perruchot, M.H., Colombel, J.F., and Darfeuille-Michaud, A. (2001) Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun* **69**: 5529-5537.
- Gori, A., Tincati, C., Rizzardini, G., Torti, C., Quirino, T., Haarman, M., Ben Amor, K., van Schaik, J., Vriesema, A., Knol, J., Marchetti, G., Welling, G., and Clerici, M. (2008) Early impairment of gut function and gut flora supporting a role for alteration of gastrointestinal mucosa in human immunodeficiency virus pathogenesis. *J Clin Microbiol* **46**: 757-758.
- Gorski, A., Wazna, E., Dabrowska, B.W., Dabrowska, K., Switala-Jelen, K., and Miedzybrodzki, R. (2006) Bacteriophage translocation. *FEMS Immunol Med Microbiol* **46**: 313-319.
- Gradel, K.O., Nielsen, H.L., Schonheyder, H.C., Ejlersen, T., Kristensen, B., and Nielsen, H. (2009) Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after *Salmonella* or *Campylobacter* gastroenteritis. *Gastroenterology* **137**: 495-501.
- Greenstein, R.J. (2003) Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet Infect Dis* **3**: 507-514.
- Grenier, D., and Mayrand, D. (1987) Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* **55**: 111-117.
- Grimoud, A.M., Marty, N., Bocquet, H., Andrieu, S., Lodter, J.P., and Chabanon, G. (2003) Colonization of the oral cavity by *Candida* species: risk factors in long-term geriatric care. *J Oral Sci* **45**: 51-55.
- Gross, V., Andus, T., Leser, H.G., Roth, M., and Scholmerich, J. (1991) Inflammatory mediators in chronic inflammatory bowel diseases. *Klin Wochenschr* **69**: 981-987.
- Grutzkau, A., Hanski, C., Hahn, H., and Riecken, E.O. (1990) Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* **31**: 1011-1015.
- Guerry, P. (2007) *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol* **15**: 456-461.
- Gui, G.P., Thomas, P.R., Tizard, M.L., Lake, J., Sanderson, J.D., and Hermon-Taylor, J. (1997) Two-year-outcomes analysis of Crohn's disease treated with rifabutin and macrolide antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **39**: 393-400.
- Gullberg, E., Leonard, M., Karlsson, J., Hopkins, A.M., Brayden, D., Baird, A.W., and Artursson, P. (2000) Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M-cell model. *Biochem Biophys Res Commun* **279**: 808-813.
- Gullberg, E., Keita, A.V., Salim, S.Y., Andersson, M., Caldwell, K.D., Soderholm, J.D., and Artursson, P. (2006) Identification of cell adhesion molecules in the human follicle-associated epithelium that improve nanoparticle uptake into the Peyer's patches. *J Pharmacol Exp Ther* **319**: 632-639.
- Gullberg, E., and Soderholm, J.D. (2006) Peyer's patches and M cells as potential sites of the inflammatory onset in Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci* **1072**: 218-232.
- Gutierrez, M.G., Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I., and Deretic, V. (2004) Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* **119**: 753-766.



- Halfvarson, J., Bodin, L., Tysk, C., Lindberg, E., and Jarnerot, G. (2003) Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* **124**: 1767-1773.
- Halme, L., Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Lappalainen, M., Farkkila, M., and Kontula, K. (2006) Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **12**: 3668-3672.
- Hammer, R.E., Maika, S.D., Richardson, J.A., Tang, J.P., and Taurog, J.D. (1990) Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* **63**: 1099-1112.
- Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F.M., Briggs, J., Gunther, S., Prescott, N.J., Onnie, C.M., Hasler, R., Sipos, B., Folsch, U.R., Lengauer, T., Platzer, M., Mathew, C.G., Krawczak, M., and Schreiber, S. (2007) A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in *ATG16L1*. *Nat Genet* **39**: 207-211.
- Harmsen, H.J., Wildeboer-Veloo, A.C., Grijpstra, J., Knol, J., Degener, J.E., and Welling, G.W. (2000) Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human feces from volunteers of different age groups. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4523-4527.
- Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G.S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., Yabashi, A., Waguri, S., Nakato, G., Kimura, S., Murakami, T., Iimura, M., Hamura, K., Fukuoka, S., Lowe, A.W., Itoh, K., Kiyono, H., and Ohno, H. (2009) Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* **462**: 226-230.
- Hayden, J.D., and Ades, S.E. (2008) The extracytoplasmic stress factor, sigmaE, is required to maintain cell envelope integrity in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* **3**: e1573.
- Hedenstrom, M., Emtenas, H., Pemberton, N., Aberg, V., Hultgren, S.J., Pinkner, J.S., Tegman, V., Almqvist, F., Sethson, I., and Kihlberg, J. (2005) NMR studies of interactions between periplasmic chaperones from uropathogenic *E. coli* and pilicides that interfere with chaperone function and pilus assembly. *Org Biomol Chem* **3**: 4193-4200.
- Hetz, C., Thielen, P., Matus, S., Nassif, M., Court, F., Kiffin, R., Martinez, G., Cuervo, A.M., Brown, R.H., and Glimcher, L.H. (2009) XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev* **23**: 2294-2306.
- Heyde, M., and Portalier, R. (1987) Regulation of major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K 12 by pH. *Mol Gen Genet* **208**: 511-517.
- Hickson, M., D'Souza, A.L., Muthu, N., Rogers, T.R., Want, S., Rajkumar, C., and Bulpitt, C.J. (2007) Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *Bmj* **335**: 80.
- Hisamatsu, T., Suzuki, M., Reinecker, H.C., Nadeau, W.J., McCormick, B.A., and Podolsky, D.K. (2003) CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**: 993-1000.
- Hisert, K.B., MacCoss, M., Shiloh, M.U., Darwin, K.H., Singh, S., Jones, R.A., Ehrt, S., Zhang, Z., Gaffney, B.L., Gandotra, S., Holden, D.W., Murray, D., and Nathan, C. (2005) A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of *Salmonella* controls bacterial survival in mice, antioxidant defence and killing of macrophages: role of cyclic diGMP. *Mol Microbiol* **56**: 1234-1245.
- Hoekstra, D., van der Laan, J.W., de Leij, L., and Witholt, B. (1976) Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **455**: 889-899.



- Hoentjen, F., Harmsen, H.J., Braat, H., Torrice, C.D., Mann, B.A., Sartor, R.B., and Dieleman, L.A. (2003) Antibiotics with a selective aerobic or anaerobic spectrum have different therapeutic activities in various regions of the colon in interleukin 10 gene deficient mice. *Gut* **52**: 1721-1727.
- Hofmann, A.F. (1999) Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol Sci* **14**: 24-29.
- Holdeman, L.V., Good, I.J., and Moore, W.E. (1976) Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl Environ Microbiol* **31**: 359-375.
- Hollander, D., Vadheim, C.M., Brettholz, E., Petersen, G.M., Delahunty, T., and Rotter, J.I. (1986) Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* **105**: 883-885.
- Homer, C.R., Richmond, A.L., Rebert, N.A., Achkar, J.P., and McDonald, C. (2010) ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology* **139**: 1630-1641, 1641 e1631-1632.
- Homewood, R., Gibbons, C.P., Richards, D., Lewis, A., Duane, P.D., and Griffiths, A.P. (2003) Ileitis due to *Yersinia pseudotuberculosis* in Crohn's disease. *J Infect* **47**: 328-332.
- Hommers, D.W., Oldenburg, B., van Bodegraven, A.A., van Hogezaand, R.A., de Jong, D.J., Romberg-Camps, M.J., van der Woude, J., and Dijkstra, G. (2006) Guidelines for treatment with infliximab for Crohn's disease. *Neth J Med* **64**: 219-229.
- Hooper, L.V., and Macpherson, A.J. (2010) Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* **10**: 159-169.
- Horiuchi, S., Inagaki, Y., Okamura, N., Nakaya, R., and Yamamoto, N. (1992) Type 1 pili enhance the invasion of *Salmonella braenderup* and *Salmonella* Typhimurium to HeLa cells. *Microbiol Immunol* **36**: 593-602.
- Horstman, A.L., and Kuehn, M.J. (2002) Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway. *J Biol Chem* **277**: 32538-32545.
- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1993) Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* **260**: 547-549.
- Hsieh, Y.C., Liang, S.M., Tsai, W.L., Chen, Y.H., Liu, T.Y., and Liang, C.M. (2003) Study of capsular polysaccharide from *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* **71**: 3329-3336.
- Huang, Y., Hong, J., Zheng, S., Ding, Y., Guo, S., Zhang, H., Zhang, X., Du, Q., and Liang, Z. (2011) Elimination pathways of systemically delivered siRNA. *Mol Ther* **19**: 381-385.
- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., and Thomas, G. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**: 599-603.
- Hugot, J.P., Alberti, C., Berrebi, D., Bingen, E., and Cezard, J.P. (2003) Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* **362**: 2012-2015.
- Huijsdens, X.W., Linskens, R.K., Taspinar, H., Meuwissen, S.G., Vandenbroucke-Grauls, C.M., and Savelkoul, P.H. (2003) *Listeria monocytogenes* and inflammatory bowel disease: detection of *Listeria* species in intestinal mucosal biopsies by real-time PCR. *Scand J Gastroenterol* **38**: 332-333.
- Humphreys, S., Stevenson, A., Bacon, A., Weinhardt, A.B., and Roberts, M. (1999) The alternative sigma factor, sigmaE, is critically important for the virulence of *Salmonella* Typhimurium. *Infect Immun* **67**: 1560-1568.



- Iizuka, M., Nakagomi, O., Chiba, M., Ueda, S., and Masamune, O. (1995) Absence of measles virus in Crohn's disease. *Lancet* **345**: 199.
- Intemann, C.D., Thye, T., Niemann, S., Browne, E.N., Amanua Chinbuah, M., Enimil, A., Gyapong, J., Osei, I., Owusu-Dabo, E., Helm, S., Rusch-Gerdes, S., Horstmann, R.D., and Meyer, C.G. (2009) Autophagy gene variant *IRGM* -261T contributes to protection from tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* but not by *M. africanum* strains. *PLoS Pathog* **5**: e1000577.
- Isberg, R.R., Voorhis, D.L., and Falkow, S. (1987) Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* **50**: 769-778.
- Isberg, R.R., and Leong, J.M. (1990) Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* **60**: 861-871.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006) The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**: 1121-1133.
- Iwakura, Y., and Ishigame, H. (2006) The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* **116**: 1218-1222.
- Jacobson, N.G., Szabo, S.J., Weber-Nordt, R.M., Zhong, Z., Schreiber, R.D., Darnell, J.E., Jr., and Murphy, K.M. (1995) Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med* **181**: 1755-1762.
- Jansen, G.J., Wildeboer-Veloo, A.C., Tonk, R.H., Franks, A.H., and Welling, G.W. (1999) Development and validation of an automated, microscopy-based method for enumeration of groups of intestinal bacteria. *J Microbiol Methods* **37**: 215-221.
- Jawhara, S., and Poulain, D. (2007) *Saccharomyces boulardii* decreases inflammation and intestinal colonization by *Candida albicans* in a mouse model of chemically-induced colitis. *Med Mycol* **45**: 691-700.
- Jenne, D.E., Tschopp, J., Ludemann, J., Utecht, B., and Gross, W.L. (1990) Wegener's autoantigen decoded. *Nature* **346**: 520.
- Jepson, M.A., Mason, C.M., Clark, M.A., Simmons, N.L., and Hirst, B.H. (1995) Variations in lectin binding properties of intestinal M cells. *J Drug Target* **3**: 75-77.
- Jergens, A.E., Wilson-Welder, J.H., Dorn, A., Henderson, A., Liu, Z., Evans, R.B., Hostetter, J., and Wannemuehler, M.J. (2007) *Helicobacter bilis* triggers persistent immune reactivity to antigens derived from the commensal bacteria in gnotobiotic C3H/HeN mice. *Gut* **56**: 934-940.
- Jiang, H.Q., Kushnir, N., Thurnheer, M.C., Bos, N.A., and Cebra, J.J. (2002) Monoassociation of SCID mice with *Helicobacter muridarum*, but not four other enterics, provokes IBD upon receipt of T cells. *Gastroenterology* **122**: 1346-1354.
- Johnson, J.R. (1991) Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* **4**: 80-128.
- Jones, B.D., Ghori, N., and Falkow, S. (1994) *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* **180**: 15-23.
- Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Vandamme, P., and Vermeire, S. (2011) Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* **60**: 631-637.
- Joossens, S., Reinisch, W., Vermeire, S., Sendid, B., Poulain, D., Peeters, M., Geboes, K., Bossuyt, X., Vandewalle, P., Oberhuber, G., Vogelsang, H., Rutgeerts, P., and Colombel, J.F. (2002) The value of serologic markers in indeterminate colitis: a prospective follow-up study. *Gastroenterology* **122**: 1242-1247.
- Juillerat, P., Mottet, C., Froehlich, F., Felley, C., Vader, J.P., Burnand, B., Gonvers, J.J., and Michetti, P. (2005) Extraintestinal manifestations of Crohn's disease. *Digestion* **71**: 31-36.





- Junt, T., Scandella, E., and Ludewig, B. (2008) Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat Rev Immunol* **8**: 764-775.
- Kader, A., Simm, R., Gerstel, U., Morr, M., and Romling, U. (2006) Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **60**: 602-616.
- Kadurugamuwa, J.L., and Beveridge, T.J. (1999) Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other gram-negative bacteria. *Microbiology* **145** (Pt 8): 2051-2060.
- Kallinowski, F., Wassmer, A., Hofmann, M.A., Harmsen, D., Heesemann, J., Karch, H., Herfarth, C., and Buhr, H.J. (1998) Prevalence of enteropathogenic bacteria in surgically treated chronic inflammatory bowel disease. *Hepato gastroenterology* **45**: 1552-1558.
- Kalliomaki, M., Collado, M.C., Salminen, S., and Isolauri, E. (2008) Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr* **87**: 534-538.
- Kang, S., Denman, S.E., Morrison, M., Yu, Z., Dore, J., Leclerc, M., and McSweeney, C.S. (2010) Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn's disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray. *Inflamm Bowel Dis* **16**: 2034-2042.
- Kang, S.S., Bloom, S.M., Norian, L.A., Geske, M.J., Flavell, R.A., Stappenbeck, T.S., and Allen, P.M. (2008) An antibiotic-responsive mouse model of fulminant ulcerative colitis. *PLoS Med* **5**: e41.
- Kaniuk, N.A., Vinogradov, E., Li, J., Monteiro, M.A., and Whitfield, C. (2004) Chromosomal and plasmid-encoded enzymes are required for assembly of the R3-type core oligosaccharide in the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* **279**: 31237-31250.
- Kaper, J.B. (2005) Pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* **295**: 355-356.
- Kaser, A., Lee, A.H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., and Blumberg, R.S. (2008) XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* **134**: 743-756.
- Kassinen, A., Krogius-Kurikka, L., Makivuokko, H., Rinttila, T., Paulin, L., Corander, J., Malinen, E., Apajalahti, J., and Palva, A. (2007) The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology* **133**: 24-33.
- Kato, S., Kowashi, Y., and Demuth, D.R. (2002) Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb Pathog* **32**: 1-13.
- Kawai, T., and Akira, S. (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ* **13**: 816-825.
- Keating, G.M., and Perry, C.M. (2002) Infliximab: an updated review of its use in Crohn's disease and rheumatoid arthritis. *BioDrugs* **16**: 111-148.
- Keighley, M.R., Arabi, Y., Dimock, F., Burdon, D.W., Allan, R.N., and Alexander-Williams, J. (1978) Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora. *Gut* **19**: 1099-1104.
- Keita, A.V., Salim, S.Y., Jiang, T., Yang, P.C., Franzen, L., Soderkvist, P., Magnusson, K.E., and Soderholm, J.D. (2008) Increased uptake of non-pathogenic *E. coli* via the follicle-associated epithelium in longstanding ileal Crohn's disease. *J Pathol* **215**: 135-144.
- Kelsall, B. (2008) Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages. *Mucosal Immunol* **1**: 460-469.
- Kerneis, S., Bogdanova, A., Kraehenbuhl, J.P., and Pringault, E. (1997) Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* **277**: 949-952.



- Khan, K.J., Ullman, T.A., Ford, A.C., Abreu, M.T., Abadir, A., Marshall, J.K., Talley, N.J., and Moayyedi, P. (2011) Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* **106**: 661-673.
- Khor, B., Gardet, A., and Xavier, R.J. (2011) Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **474**: 307-317.
- King, T.E., Jr., Savici, D., and Campbell, P.A. (1988) Phagocytosis and killing of *Listeria monocytogenes* by alveolar macrophages: smokers versus nonsmokers. *J Infect Dis* **158**: 1309-1316.
- Kirjavainen, P.V., Arvola, T., Salminen, S.J., and Isolauri, E. (2002) Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning? *Gut* **51**: 51-55.
- Kisand, K., Boe Wolff, A.S., Podkrajsek, K.T., Tserel, L., Link, M., Kisand, K.V., Ersvaer, E., Perheentupa, J., Erichsen, M.M., Bratanic, N., Meloni, A., Cetani, F., Perniola, R., Ergun-Longmire, B., Maclaren, N., Krohn, K.J., Pura, M., Schalke, B., Strobel, P., Leite, M.I., Battelino, T., Husebye, E.S., Peterson, P., Willcox, N., and Meager, A. (2010) Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J Exp Med* **207**: 299-308.
- Kiyono, H., and Fukuyama, S. (2004) NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* **4**: 699-710.
- Kleessen, B., Kroesen, A.J., Buhr, H.J., and Blaut, M. (2002) Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol* **37**: 1034-1041.
- Kobayashi, K.S., Chamailard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G., and Flavell, R.A. (2005) Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **307**: 731-734.
- Kobayashi, T., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kamada, N., Chinen, H., Saito, R., Kitazume, M.T., Nakazawa, A., Sugita, A., Koganei, K., Isobe, K., and Hibi, T. (2008) IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* **57**: 1682-1689.
- Konrad, A., Rutten, C., Flogerzi, B., Styner, M., Goke, B., and Seibold, F. (2004) Immune sensitization to yeast antigens in ASCA-positive patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **10**: 97-105.
- Kotlowski, R., Bernstein, C.N., Sepehri, S., and Krause, D.O. (2007) High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* **56**: 669-675.
- Kovacikova, G., and Skorupski, K. (2002) The alternative sigma factor sigma(E) plays an important role in intestinal survival and virulence in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **70**: 5355-5362.
- Krause, D.O., Little, A.C., Dowd, S.E., and Bernstein, C.N. (2010) Complete genome sequence of adherent invasive *Escherichia coli* UM146 isolated from Ileal Crohn's disease biopsy tissue. *J Bacteriol* **193**: 583.
- Kucharzik, T., Maaser, C., Lugerling, A., Kagnoff, M., Mayer, L., Targan, S., and Domschke, W. (2006) Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. *Inflamm Bowel Dis* **12**: 1068-1083.
- Kuehn, M.J., and Kesty, N.C. (2005) Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* **19**: 2645-2655.
- Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Muller, W. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**: 263-274.
- Kulasakara, H., Lee, V., Brencic, A., Liberati, N., Urbach, J., Miyata, S., Lee, D.G., Neely, A.N., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Ausubel, F.M., and Lory, S. (2006) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2839-2844.



- Kulkarni, A.B., Ward, J.M., Yaswen, L., Mackall, C.L., Bauer, S.R., Huh, C.G., Gress, R.E., and Karlsson, S. (1995) Transforming growth factor-beta 1 null mice. An animal model for inflammatory disorders. *Am J Pathol* **146**: 264-275.
- Kullberg, M.C., Ward, J.M., Gorelick, P.L., Caspar, P., Hieny, S., Cheever, A., Jankovic, D., and Sher, A. (1998) Helicobacter hepaticus triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12- and gamma interferon-dependent mechanism. *Infect Immun* **66**: 5157-5166.
- Kuolee, R., and Chen, W. (2008) M cell-targeted delivery of vaccines and therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv* **5**: 693-702.
- Kurata, J.H., Kantor-Fish, S., Frankl, H., Godby, P., and Vadheim, C.M. (1992) Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology* **102**: 1940-1948.
- Laffineur, G., Lescut, D., Vincent, P., Quandalle, P., Wurtz, A., and Colombel, J.F. (1992) [Bacterial translocation in Crohn disease]. *Gastroenterol Clin Biol* **16**: 777-781.
- Lamps, L.W., Madhusudhan, K.T., Havens, J.M., Greenson, J.K., Bronner, M.P., Chiles, M.C., Dean, P.J., and Scott, M.A. (2003) Pathogenic *Yersinia* DNA is detected in bowel and mesenteric lymph nodes from patients with Crohn's disease. *Am J Surg Pathol* **27**: 220-227.
- Landers, C.J., Cohavy, O., Misra, R., Yang, H., Lin, Y.C., Braun, J., and Targan, S.R. (2002) Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology* **123**: 689-699.
- Lapaquette, P., Glasser, A.L., Huett, A., Xavier, R.J., and Darfeuille-Michaud, A. (2009) Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol*.
- Lapaquette, P., Bringer, M.A., and Darfeuille-Michaud, A. (2011) Defects in autophagy favour adherent-invasive *E. coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell Microbiol* **Under revision**.
- Lapidus, A., and Einarsson, C. (1998) Bile composition in patients with ileal resection due to Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **4**: 89-94.
- Lapidus, A., Akerlund, J.E., and Einarsson, C. (2006) Gallbladder bile composition in patients with Crohn 's disease. *World J Gastroenterol* **12**: 70-74.
- Lay, C., Sutren, M., Rochet, V., Saunier, K., Dore, J., and Rigottier-Gois, L. (2005) Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota. *Environ Microbiol* **7**: 933-946.
- Lees, C.W., Barrett, J.C., Parkes, M., and Satsangi, J. (2010) New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut*.
- Leipold, M.D., Vinogradov, E., and Whitfield, C. (2007) Glycosyltransferases involved in biosynthesis of the outer core region of *Escherichia coli* lipopolysaccharides exhibit broader substrate specificities than is predicted from lipopolysaccharide structures. *J Biol Chem* **282**: 26786-26792.
- Lelouard, H., Fallet, M., De Bovis, B., Meresse, S., and Gorvel, J.P. (2011) Peyer's patch dendritic cells sample antigens by extending dendrites through M cell-specific transcellular pores. *Communication affichée à l'International Congress of Mucosal Immunology, Paris, 2011*.
- Lepage, P., Seksik, P., Sutren, M., de la Cochetiere, M.F., Jian, R., Marteau, P., and Dore, J. (2005) Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis* **11**: 473-480.
- Lepage, P., Colombet, J., Marteau, P., Sime-Ngando, T., Dore, J., and Leclerc, M. (2008) Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut* **57**: 424-425.



- Lerebours, E., Savoye, G., and Guedon, C. (2003) [Epidemiology and natural history of chronic inflammatory bowel disease]. *Gastroenterol Clin Biol* **27**: S76-80.
- Lerner, A. (2007) Aluminum is a potential environmental factor for Crohn's disease induction: extended hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* **1107**: 329-345.
- Levine, B., and Deretic, V. (2007) Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **7**: 767-777.
- Ley, R.E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., and Gordon, J.I. (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11070-11075.
- Lim, B., Beyhan, S., Meir, J., and Yildiz, F.H. (2006) Cyclic-diGMP signal transduction systems in *Vibrio cholerae*: modulation of rugosity and biofilm formation. *Mol Microbiol* **60**: 331-348.
- Lin, L., Ibrahim, A.S., Xu, X., Farber, J.M., Avanesian, V., Baquir, B., Fu, Y., French, S.W., Edwards, J.E., Jr., and Spellberg, B. (2009) Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLoS Pathog* **5**: e1000703.
- Liu, X., and Ferenci, T. (2001) An analysis of multifactorial influences on the transcriptional control of ompF and ompC porin expression under nutrient limitation. *Microbiology* **147**: 2981-2989.
- Liu, Y., van Kruiningen, H.J., West, A.B., Cartun, R.W., Cortot, A., and Colombel, J.F. (1995) Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology* **108**: 1396-1404.
- Lodes, M.J., Cong, Y., Elson, C.O., Mohamath, R., Landers, C.J., Targan, S.R., Fort, M., and Hershberg, R.M. (2004) Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* **113**: 1296-1306.
- Lodish, H.F., Zhou, B., Liu, G., and Chen, C.Z. (2008) Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nat Rev Immunol* **8**: 120-130.
- Londono-Arcila, P., Freeman, D., Kleanthous, H., O'Dowd, A.M., Lewis, S., Turner, A.K., Rees, E.L., Tibbitts, T.J., Greenwood, J., Monath, T.P., and Darsley, M.J. (2002) Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi expressing urease effectively immunizes mice against *Helicobacter pylori* challenge as part of a heterologous mucosal priming-parenteral boosting vaccination regimen. *Infect Immun* **70**: 5096-5106.
- Macpherson, A., Khoo, U.Y., Forgacs, I., Philpott-Howard, J., and Bjarnason, I. (1996) Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* **38**: 365-375.
- Maeda, S., Hsu, L.C., Liu, H., Bankston, L.A., Iimura, M., Kagnoff, M.F., Eckmann, L., and Karin, M. (2005) Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* **307**: 734-738.
- Main, J., McKenzie, H., Yeaman, G.R., Kerr, M.A., Robson, D., Pennington, C.R., and Parratt, D. (1988) Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. *Bmj* **297**: 1105-1106.
- Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., Roca, J., and Dore, J. (2006) Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* **55**: 205-211.
- Mannon, P.J., Fuss, I.J., Mayer, L., Elson, C.O., Sandborn, W.J., Present, D., Dolin, B., Goodman, N., Groden, C., Hornung, R.L., Quezado, M., Yang, Z., Neurath, M.F., Salfeld, J., Veldman, G.M., Schwertschlag, U., and Strober, W. (2004) Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* **351**: 2069-2079.
- Marks, J.W., Conley, D.R., Capretta, T.L., Bonorris, G.G., Chung, A., Coyne, M.J., and Schoenfield, L.J. (1977) Gallstone prevalence and biliary lipid composition in inflammatory bowel disease. *Am J Dig Dis* **22**: 1097-1100.





- Marteau, P., and Chaput, U. (2011) Bacteria as trigger for chronic gastrointestinal disorders. *Dig Dis* **29**: 166-171.
- Martin, H.M., Campbell, B.J., Hart, C.A., Mpfu, C., Nayar, M., Singh, R., Englyst, H., Williams, H.F., and Rhodes, J.M. (2004) Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* **127**: 80-93.
- Martinez, C., Antolin, M., Santos, J., Torrejon, A., Casellas, F., Borruel, N., Guarner, F., and Malagelada, J.R. (2008) Unstable composition of the fecal microbiota in ulcerative colitis during clinical remission. *Am J Gastroenterol* **103**: 643-648.
- Martinez, J.J., Mulvey, M.A., Schilling, J.D., Pinkner, J.S., and Hultgren, S.J. (2000) Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *Embo J* **19**: 2803-2812.
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Gonzalez-Huix, F., Acero, D., and Garcia-Gil, L.J. (2006) 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* **12**: 1136-1145.
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M., Gonzalez-Huix, F., Lopez-Oliu, C., Dahbi, G., Blanco, J.E., Blanco, J., Garcia-Gil, L.J., and Darfeuille-Michaud, A. (2009a) Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: New ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*.
- Martinez-Medina, M., Naves, P., Blanco, J., Aldeguer, X., Blanco, J.E., Blanco, M., Ponte, C., Soriano, F., Darfeuille-Michaud, A., and Garcia-Gil, L.J. (2009b) Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). *BMC Microbiol* **9**: 202.
- Masseret, E., Boudeau, J., Colombel, J.F., Neut, C., Desreumaux, P., Joly, B., Cortot, A., and Darfeuille-Michaud, A. (2001) Genetically related *Escherichia coli* strains associated with Crohn's disease. *Gut* **48**: 320-325.
- Matsui, T., Iida, M., Fujishima, M., Imai, K., and Yao, T. (1990) Increased sugar consumption in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterol Jpn* **25**: 271.
- Matsumoto, S., Okabe, Y., Setoyama, H., Takayama, K., Ohtsuka, J., Funahashi, H., Imaoka, A., Okada, Y., and Umesaki, Y. (1998) Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. *Gut* **43**: 71-78.
- Mazmanian, S.K., Round, J.L., and Kasper, D.L. (2008) A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* **453**: 620-625.
- McCarroll, S.A., Huett, A., Kuballa, P., Chilewski, S.D., Landry, A., Goyette, P., Zody, M.C., Hall, J.L., Brant, S.R., Cho, J.H., Duerr, R.H., Silverberg, M.S., Taylor, K.D., Rioux, J.D., Altshuler, D., Daly, M.J., and Xavier, R.J. (2008) Deletion polymorphism upstream of *IRGM* associated with altered *IRGM* expression and Crohn's disease. *Nat Genet* **40**: 1107-1112.
- McGovern, D.P., Rotter, J.I., Mei, L., Haritunians, T., Landers, C., Derkowski, C., Dutridge, D., Dubinsky, M., Ippoliti, A., Vasilias, E., Mengesha, E., King, L., Pressman, S., Targan, S.R., and Taylor, K.D. (2009) Genetic epistasis of IL23/IL17 pathway genes in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **15**: 883-889.
- Meconi, S., Vercellone, A., Levillain, F., Payre, B., Al Saati, T., Capilla, F., Desreumaux, P., Darfeuille-Michaud, A., and Altare, F. (2007) Adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients induce granulomas *in vitro*. *Cell Microbiol* **9**: 1252-1261.
- Mei, L., Targan, S.R., Landers, C.J., Dutridge, D., Ippoliti, A., Vasilias, E.A., Papadakis, K.A., Fleshner, P.R., Rotter, J.I., and Yang, H. (2006) Familial expression of anti-*Escherichia coli* outer membrane porin C in relatives of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **130**: 1078-1085.



- Meinzer, U., Esmiol-Welterlin, S., Barreau, F., Berrebi, D., Dussailant, M., Bonacorsi, S., Chareyre, F., Niwa-Kawakita, M., Alberti, C., Sterkers, G., Villard, C., Lesuffleur, T., Peuchmaur, M., Karin, M., Eckmann, L., Giovannini, M., Ollendorff, V., Wolf-Watz, H., and Hugot, J.P. (2008) Nod2 mediates susceptibility to *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. *PLoS One* **3**: e2769.
- Meresse, S., Steele-Mortimer, O., Finlay, B.B., and Gorvel, J.P. (1999) The rab7 GTPase controls the maturation of *Salmonella* Typhimurium-containing vacuoles in HeLa cells. *Embo J* **18**: 4394-4403.
- Merlin, D., Si-Tahar, M., Sitaraman, S.V., Eastburn, K., Williams, I., Liu, X., Hediger, M.A., and Madara, J.L. (2001) Colonic epithelial hPepT1 expression occurs in inflammatory bowel disease: transport of bacterial peptides influences expression of MHC class 1 molecules. *Gastroenterology* **120**: 1666-1679.
- Meuwis, M.A., Fillet, M., Geurts, P., de Seny, D., Lutteri, L., Chapelle, J.P., Bours, V., Wehenkel, L., Belaiche, J., Malaise, M., Louis, E., and Merville, M.P. (2007) Biomarker discovery for inflammatory bowel disease, using proteomic serum profiling. *Biochem Pharmacol* **73**: 1422-1433.
- Miquel, S., Peyretailade, E., Claret, L., de Vallee, A., Dossat, C., Vacherie, B., Zineb el, H., Segurens, B., Barbe, V., Sauvanet, P., Neut, C., Colombel, J.F., Medigue, C., Mojica, F.J., Peyret, P., Bonnet, R., and Darfeuille-Michaud, A. (2010) Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS One* **5**.
- Missiakas, D., Mayer, M.P., Lemaire, M., Georgopoulos, C., and Raina, S. (1997) Modulation of the *Escherichia coli* sigmaE (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Mol Microbiol* **24**: 355-371.
- Miyamoto, H., Tanaka, T., Kitamoto, N., Fukuda, Y., and Shimoyama, T. (1995) Detection of immunoreactive antigen, with a monoclonal antibody to measles virus, in tissue from a patient with Crohn's disease. *J Gastroenterol* **30**: 28-33.
- Mizuno, T. (1997) Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res* **4**: 161-168.
- Mizushima, N. (2007) Autophagy: process and function. *Genes Dev* **21**: 2861-2873.
- Mombaerts, P., Clarke, A.R., Rudnicki, M.A., Iacomini, J., Itohara, S., Lafaille, J.J., Wang, L., Ichikawa, Y., Jaenisch, R., Hooper, M.L., and et al. (1992) Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature* **360**: 225-231.
- Mondot, S., Kang, S., Furet, J.P., Aguirre de Carcer, D., McSweeney, C., Morrison, M., Marteau, P., Dore, J., and Leclerc, M. (2011) Highlighting new phylogenetic specificities of Crohn's disease microbiota. *Inflamm Bowel Dis* **17**: 185-192.
- Monsen, U., Bernell, O., Johansson, C., and Hellers, G. (1991) Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* **26**: 302-306.
- Moore, W.E., and Holdeman, L.V. (1974) Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol* **27**: 961-979.
- Morson, B.C. (1972) The early histological lesion of Crohn's disease. *Proc R Soc Med* **65**: 71-72.
- Morson, B.C. (1990) Pathology of Crohn's disease. *Ann R Coll Surg Engl* **72**: 150-151.
- Mow, W.S., Landers, C.J., Steinhart, A.H., Feagan, B.G., Croitoru, K., Seidman, E., Greenberg, G.R., and Targan, S.R. (2004a) High-level serum antibodies to bacterial antigens are associated with antibiotic-induced clinical remission in Crohn's disease: a pilot study. *Dig Dis Sci* **49**: 1280-1286.
- Mow, W.S., Vasiliauskas, E.A., Lin, Y.C., Fleshner, P.R., Papadakis, K.A., Taylor, K.D., Landers, C.J., Abreu-Martin, M.T., Rotter, J.I., Yang, H., and Targan, S.R. (2004b) Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* **126**: 414-424.



- Mulvey, M.A., Lopez-Boado, Y.S., Wilson, C.L., Roth, R., Parks, W.C., Heuser, J., and Hultgren, S.J. (1998) Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **282**: 1494-1497.
- Mylonaki, M., Rayment, N.B., Rampton, D.S., Hudspith, B.N., and Brostoff, J. (2005) Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **11**: 481-487.
- Nadal, I., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., and Sanz, Y. (2007) Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J Med Microbiol* **56**: 1669-1674.
- Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., Hamada, S., and Yoshimori, T. (2004) Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* **306**: 1037-1040.
- Nakamura, R.M., Matsutani, M., and Barry, M. (2003) Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta* **335**: 9-20.
- Naser, S.A., Hulten, K., Shafran, I., Graham, D.Y., and El-Zaatari, F.A. (2000) Specific seroreactivity of Crohn's disease patients against p35 and p36 antigens of *M. avium* subsp. Paratuberculosis. *Vet Microbiol* **77**: 497-504.
- Naser, S.A., Ghobrial, G., Romero, C., and Valentine, J.F. (2004) Culture of *Mycobacterium avium* subspecies Paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* **364**: 1039-1044.
- Nash, J.H., Villegas, A., Kropinski, A.M., Aguilar-Valenzuela, R., Konczy, P., Mascarenhas, M., Ziebell, K., Torres, A.G., Karmali, M.A., and Coombes, B.K. (2010) Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics* **11**: 667.
- Nelson, K.E., Weinstock, G.M., Highlander, S.K., Worley, K.C., Creasy, H.H., Wortman, J.R., Rusch, D.B., Mitreva, M., Sodergren, E., Chinwalla, A.T., Feldgarden, M., Gevers, D., Haas, B.J., Madupu, R., Ward, D.V., Birren, B.W., Gibbs, R.A., Methe, B., Petrosino, J.F., Strausberg, R.L., Sutton, G.G., White, O.R., Wilson, R.K., Durkin, S., Giglio, M.G., Gujja, S., Howarth, C., Kodira, C.D., Kyrpides, N., Mehta, T., Muzny, D.M., Pearson, M., Pepin, K., Pati, A., Qin, X., Yandava, C., Zeng, Q., Zhang, L., Berlin, A.M., Chen, L., Hepburn, T.A., Johnson, J., McCarrison, J., Miller, J., Minx, P., Nusbaum, C., Russ, C., Sykes, S.M., Tomlinson, C.M., Young, S., Warren, W.C., Badger, J., Crabtree, J., Markowitz, V.M., Orvis, J., Cree, A., Ferrera, S., Fulton, L.L., Fulton, R.S., Gillis, M., Hemphill, L.D., Joshi, V., Kovar, C., Torralba, M., Wetterstrand, K.A., Abouelleil, A., Wollam, A.M., Buhay, C.J., Ding, Y., Dugan, S., FitzGerald, M.G., Holder, M., Hostetler, J., Clifton, S.W., Allen-Vercoe, E., Earl, A.M., Farmer, C.N., Liolios, K., Surette, M.G., Xu, Q., Pohl, C., Wilczek-Boney, K., and Zhu, D. (2010) A catalog of reference genomes from the human microbiome. *Science* **328**: 994-999.
- Netea, M.G., Kullberg, B.J., de Jong, D.J., Franke, B., Sprong, T., Naber, T.H., Drenth, J.P., and Van der Meer, J.W. (2004) NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur J Immunol* **34**: 2052-2059.
- Neurath, M.F. (2007) IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat Med* **13**: 26-28.
- Neut, C., Bulois, P., Desreumaux, P., Membre, J.M., Lederman, E., Gambiez, L., Cortot, A., Quandalle, P., van Kruiningen, H., and Colombel, J.F. (2002) Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **97**: 939-946.
- Neutra, M.R., Frey, A., and Kraehenbuhl, J.P. (1996a) Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* **86**: 345-348.
- Neutra, M.R., Pringault, E., and Kraehenbuhl, J.P. (1996b) Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol* **14**: 275-300.



- Nicholls, S., Stephens, S., Braegger, C.P., Walker-Smith, J.A., and MacDonald, T.T. (1993) Cytokines in stools of children with inflammatory bowel disease or infective diarrhoea. *J Clin Pathol* **46**: 757-760.
- Nielsen, O.H., Kirman, I., Rudiger, N., Hendel, J., and Vainer, B. (2003) Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* **38**: 180-185.
- Niessner, M., and Volk, B.A. (1995) Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clin Exp Immunol* **101**: 428-435.
- Nikolaus, S., and Schreiber, S. (2007) Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **133**: 1670-1689.
- Nishikawa, J., Kudo, T., Sakata, S., Benno, Y., and Sugiyama, T. (2009) Diversity of mucosa-associated microbiota in active and inactive ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* **44**: 180-186.
- Nuding, S., Fellermann, K., Wehkamp, J., and Stange, E.F. (2007) Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon. *Gut* **56**: 1240-1247.
- Ofek, I., Mirelman, D., and Sharon, N. (1977) Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature* **265**: 623-625.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nunez, G., and Cho, J.H. (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**: 603-606.
- O'Hara, A.M., and Shanahan, F. (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* **7**: 688-693.
- Olive, A.J., Kenjale, R., Espina, M., Moore, D.S., Picking, W.L., and Picking, W.D. (2007) Bile salts stimulate recruitment of IpaB to the *Shigella flexneri* surface, where it colocalizes with IpaD at the tip of the type III secretion needle. *Infect Immun* **75**: 2626-2629.
- Olsen, I., Tollefsen, S., Aagaard, C., Reitan, L.J., Bannantine, J.P., Andersen, P., Sollid, L.M., and Lundin, K.E. (2009) Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies Paratuberculosis reactive CD4 T cells from intestinal biopsies of Crohn's disease patients. *PLoS One* **4**: e5641.
- Olson, T.S., Reuter, B.K., Scott, K.G., Morris, M.A., Wang, X.M., Hancock, L.N., Burcin, T.L., Cohn, S.M., Ernst, P.B., Cominelli, F., Meddings, J.B., Ley, K., and Pizarro, T.T. (2006) The primary defect in experimental ileitis originates from a nonhematopoietic source. *J Exp Med* **203**: 541-552.
- Oostenbrug, L.E., Drenth, J.P., de Jong, D.J., Nolte, I.M., Oosterom, E., van Dullemen, H.M., van der Linde, K., te Meerman, G.J., van der Steege, G., Kleibeuker, J.H., and Jansen, P.L. (2005) Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **11**: 567-575.
- Opitz, B., Puschel, A., Schmeck, B., Hocke, A.C., Rosseau, S., Hammerschmidt, S., Schumann, R.R., Suttorp, N., and Hippenstiel, S. (2004) Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **279**: 36426-36432.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J.S., Moore, K.W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J.F., and Kastelein, R.A. (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* **13**: 715-725.
- Orholm, M., Munkholm, P., Langholz, E., Nielsen, O.H., Sorensen, T.I., and Binder, V. (1991) Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **324**: 84-88.
- Orholm, M., Binder, V., Sorensen, T.I., Rasmussen, L.P., and Kyvik, K.O. (2000) Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* **35**: 1075-1081.





- Ormonde, P., Horstedt, P., O'Toole, R., and Milton, D.L. (2000) Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **182**: 2326-2328.
- Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Kanaya, S., Sugiura, M., Wanner, B.L., Mori, H., and Mizuno, T. (2002) Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **46**: 281-291.
- Ott, S.J., Musfeldt, M., Wenderoth, D.F., Hampe, J., Brant, O., Folsch, U.R., Timmis, K.N., and Schreiber, S. (2004) Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* **53**: 685-693.
- Ouyang, W., Lohning, M., Gao, Z., Assenmacher, M., Ranganath, S., Radbruch, A., and Murphy, K.M. (2000) Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* **12**: 27-37.
- Papadakis, K.A., Yang, H., Ippoliti, A., Mei, L., Elson, C.O., Hershberg, R.M., Vasiliauskas, E.A., Fleshner, P.R., Abreu, M.T., Taylor, K., Landers, C.J., Rotter, J.I., and Targan, S.R. (2007) Anti-flagellin (CBir1) phenotypic and genetic Crohn's disease associations. *Inflamm Bowel Dis* **13**: 524-530.
- Parkes, M., Barrett, J.C., Prescott, N.J., Tremelling, M., Anderson, C.A., Fisher, S.A., Roberts, R.G., Nimmo, E.R., Cummings, F.R., Soars, D., Drummond, H., Lees, C.W., Khawaja, S.A., Bagnall, R., Burke, D.A., Todhunter, C.E., Ahmad, T., Onnie, C.M., McArdle, W., Strachan, D., Bethel, G., Bryan, C., Lewis, C.M., Deloukas, P., Forbes, A., Sanderson, J., Jewell, D.P., Satsangi, J., Mansfield, J.C., Cardon, L., and Mathew, C.G. (2007) Sequence variants in the autophagy gene *IRGM* and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* **39**: 830-832.
- Parracho, H.M., Bingham, M.O., Gibson, G.R., and McCartney, A.L. (2005) Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J Med Microbiol* **54**: 987-991.
- Parrish, N.M., Radcliff, R.P., Brey, B.J., Anderson, J.L., Clark, D.L., Jr., Koziczowski, J.J., Ko, C.G., Goldberg, N.D., Brinker, D.A., Carlson, R.A., Dick, J.D., and Ellingson, J.L. (2009) Absence of *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis in Crohn's patients. *Inflamm Bowel Dis* **15**: 558-565.
- Pereira, S.P., Bain, I.M., Kumar, D., and Dowling, R.H. (2003) Bile composition in inflammatory bowel disease: ileal disease and colectomy, but not colitis, induce lithogenic bile. *Aliment Pharmacol Ther* **17**: 923-933.
- Persson, P.G., Ahlbom, A., and Hellers, G. (1992) Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology* **3**: 47-52.
- Philpott, D.J., and Viala, J. (2004) Towards an understanding of the role of NOD2/CARD15 in the pathogenesis of Crohn's disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**: 555-568.
- Philpott, K.L., Viney, J.L., Kay, G., Rastan, S., Gardiner, E.M., Chae, S., Hayday, A.C., and Owen, M.J. (1992) Lymphoid development in mice congenitally lacking T cell receptor alpha beta-expressing cells. *Science* **256**: 1448-1452.
- Pineton de Chambrun, G., Colombel, J.F., Poulain, D., and Darfeuille-Michaud, A. (2008) Pathogenic agents in inflammatory bowel diseases. *Curr Opin Gastroenterol* **24**: 440-447.
- Png, C.W., Linden, S.K., Gilshenan, K.S., Zoetendal, E.G., McSweeney, C.S., Sly, L.I., McGuckin, M.A., and Florin, T.H. (2010) Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment *in vitro* utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol* **105**: 2420-2428.
- Pope, L.M., Reed, K.E., and Payne, S.M. (1995) Increased protein secretion and adherence to HeLa cells by *Shigella* spp. following growth in the presence of bile salts. *Infect Immun* **63**: 3642-3648.
- Porter, C.K., Tribble, D.R., Aliaga, P.A., Halvorson, H.A., and Riddle, M.S. (2008) Infectious gastroenteritis and risk of developing inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **135**: 781-786.



- Prantera, C., Zannoni, F., Scribano, M.L., Berto, E., Andreoli, A., Kohn, A., and Luzi, C. (1996) An antibiotic regimen for the treatment of active Crohn's disease: a randomized, controlled clinical trial of metronidazole plus ciprofloxacin. *Am J Gastroenterol* **91**: 328-332.
- Prantera, C., Lochs, H., Campieri, M., Scribano, M.L., Sturniolo, G.C., Castiglione, F., and Cottone, M. (2006) Antibiotic treatment of Crohn's disease: results of a multicentre, double blind, randomized, placebo-controlled trial with rifaximin. *Aliment Pharmacol Ther* **23**: 1117-1125.
- Prantera, C., and Scribano, M.L. (2009) Antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease: why, when, and how. *Curr Opin Gastroenterol* **25**: 329-333.
- Pratt, L.A., Hsing, W., Gibson, K.E., and Silhavy, T.J. (1996) From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **20**: 911-917.
- Prescott, N.J., Dominy, K.M., Kubo, M., Lewis, C.M., Fisher, S.A., Redon, R., Huang, N., Stranger, B.E., Blaszczyk, K., Hudspith, B., Parkes, G., Hosono, N., Yamazaki, K., Onnie, C.M., Forbes, A., Dermitzakis, E.T., Nakamura, Y., Mansfield, J.C., Sanderson, J., Hurles, M.E., Roberts, R.G., and Mathew, C.G. (2010) Independent and population-specific association of risk variants at the IRGM locus with Crohn's disease. *Hum Mol Genet* **19**: 1828-1839.
- Present, D.H. (1999) Review article: the efficacy of infliximab in Crohn's disease--healing of fistulae. *Aliment Pharmacol Ther* **13 Suppl 4**: 23-28; discussion 38.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., and Ehrlich, S.D. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**: 59-65.
- Quinton, J.F., Sendid, B., Reumaux, D., Duthilleul, P., Cortot, A., Grandbastien, B., Charrier, G., Targan, S.R., Colombel, J.F., and Poulain, D. (1998) Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* **42**: 788-791.
- Randow, F., and Seed, B. (2001) Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nat Cell Biol* **3**: 891-896.
- Rath, H.C., Herfarth, H.H., Ikeda, J.S., Grenther, W.B., Hamm, T.E., Jr., Balish, E., Taurog, J.D., Hammer, R.E., Wilson, K.H., and Sartor, R.B. (1996) Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* **98**: 945-953.
- Reif, S., Klein, I., Lubin, F., Farbstein, M., Hallak, A., and Gilat, T. (1997) Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* **40**: 754-760.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* **2**: 361-367.
- Rhodiou, V.A., Suh, W.C., Nonaka, G., West, J., and Gross, C.A. (2006) Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS Biol* **4**: e2.
- Riedel, C.U., Monk, I.R., Casey, P.G., Waidmann, M.S., Gahan, C.G., and Hill, C. (2009) AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **71**: 1177-1189.



- Rigottier-Gois, L., Bourhis, A.G., Gramet, G., Rochet, V., and Dore, J. (2003) 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* **43**: 237-245.
- Riley, P.A. (2004) Bacteriophages in autoimmune disease and other inflammatory conditions. *Med Hypotheses* **62**: 493-498.
- Rioux, J.D., Xavier, R.J., Taylor, K.D., Silverberg, M.S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, M.M., Datta, L.W., Shugart, Y.Y., Griffiths, A.M., Targan, S.R., Ippoliti, A.F., Bernard, E.J., Mei, L., Nicolae, D.L., Regueiro, M., Schumm, L.P., Steinhart, A.H., Rotter, J.I., Duerr, R.H., Cho, J.H., Daly, M.J., and Brant, S.R. (2007) Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* **39**: 596-604.
- Rizzo, A., Pallone, F., Monteleone, G., and Fantini, M.C. (2011) Intestinal inflammation and colorectal cancer: A double-edged sword? *World J Gastroenterol* **17**: 3092-3100.
- Roberts, R.L., Hollis-Moffatt, J.E., Geary, R.B., Kennedy, M.A., Barclay, M.L., and Merriman, T.R. (2008) Confirmation of association of *IRGM* and *NCF4* with ileal Crohn's disease in a population-based cohort. *Genes Immun* **9**: 561-565.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Mejean, V., and Foglino, M. (2000) Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol* **8**: 498-504.
- Rojas-Lopez, M., Arenas-Hernandez, M.M., Medrano-Lopez, A., Martinez de la Pena, C.F., Puente, J.L., Martinez-Laguna, Y., and Torres, A.G. (2011) Regulatory control of the *Escherichia coli* O157:H7 *lpf1* operon by H-NS and Ler. *J Bacteriol* **193**: 1622-1632.
- Rolhion, N., Barnich, N., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2005) Strong decrease in invasive ability and outer membrane vesicle release in Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 with the *yfgL* gene deleted. *J Bacteriol* **187**: 2286-2296.
- Rolhion, N., Carvalho, F.A., and Darfeuille-Michaud, A. (2007) OmpC and the sigma(E) regulatory pathway are involved in adhesion and invasion of the Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82. *Mol Microbiol* **63**: 1684-1700.
- Rolhion, N., Barnich, N., Bringer, M.A., Glasser, A.L., Ranc, J., Hebuterne, X., Hofman, P., and Darfeuille-Michaud, A. (2010) Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive *Escherichia coli* invasion. *Gut*.
- Rolhion, N., Hofman, P., and Darfeuille-Michaud, A. (2011) The endoplasmic reticulum stress response chaperone: Gp96, a host receptor for Crohn disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Gut Microbes* **2**: 115-119.
- Romero, C., Hamdi, A., Valentine, J.F., and Naser, S.A. (2005) Evaluation of surgical tissue from patients with Crohn's disease for the presence of *Mycobacterium avium* subspecies Paratuberculosis DNA by in situ hybridization and nested polymerase chain reaction. *Inflamm Bowel Dis* **11**: 116-125.
- Roth, M.P., Petersen, G.M., McElree, C., Feldman, E., and Rotter, J.I. (1989a) Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **97**: 900-904.
- Roth, M.P., Petersen, G.M., McElree, C., Vadheim, C.M., Panish, J.F., and Rotter, J.I. (1989b) Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology* **96**: 1016-1020.
- Roush, S., and Slack, F.J. (2008) The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol* **18**: 505-516.
- Ruseler-van Embden, J.G., and Both-Patoir, H.C. (1983) Anaerobic gram-negative faecal flora in patients with Crohn's disease and healthy subjects. *Antonie Van Leeuwenhoek* **49**: 125-132.



- Russel, M.G., Engels, L.G., Muris, J.W., Limonard, C.B., Volovics, A., Brummer, R.J., and Stockbrugger, R.W. (1998) Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **10**: 243-249.
- Rutgeerts, P., Ghoois, Y., Vantrappen, G., and Fevery, J. (1986) Biliary lipid composition in patients with nonoperated Crohn's disease. *Dig Dis Sci* **31**: 27-32.
- Rutgeerts, P., Goboos, K., Peeters, M., Hiele, M., Penninckx, F., Aerts, R., Kerremans, R., and Vantrappen, G. (1991) Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet* **338**: 771-774.
- Rutgeerts, P., and Baert, F. (1999) New strategies in the management of inflammatory bowel disease. *Acta Clin Belg* **54**: 274-280.
- Rutgeerts, P., D'Haens, G., Targan, S., Vasilias, E., Hanauer, S.B., Present, D.H., Mayer, L., Van Hogezaand, R.A., Braakman, T., DeWoody, K.L., Schaible, T.F., and Van Deventer, S.J. (1999) Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology* **117**: 761-769.
- Ryan, P., Bennett, M.W., Aarons, S., Lee, G., Collins, J.K., O'Sullivan, G.C., O'Connell, J., and Shanahan, F. (2002) PCR detection of *Mycobacterium* Paratuberculosis in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection. *Gut* **51**: 665-670.
- Ryan, P., Kelly, R.G., Lee, G., Collins, J.K., O'Sullivan, G.C., O'Connell, J., and Shanahan, F. (2004) Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease--detection by laser capture microdissection and PCR. *Am J Gastroenterol* **99**: 1539-1543.
- Salim, S.Y., Silva, M.A., Keita, A.V., Larsson, M., Andersson, P., Magnusson, K.E., Perdue, M.H., and Soderholm, J.D. (2009) CD83+CCR7- dendritic cells accumulate in the subepithelial dome and internalize translocated *Escherichia coli* HB101 in the Peyer's patches of ileal Crohn's disease. *Am J Pathol* **174**: 82-90.
- Salim, S.Y., and Soderholm, J.D. (2011) Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* **17**: 362-381.
- Samaranayake, L.P., Hughes, A., Weetman, D.A., and MacFarlane, T.W. (1986) Growth and acid production of *Candida* species in human saliva supplemented with glucose. *J Oral Pathol* **15**: 251-254.
- Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Hanauer, S.B., Lochs, H., Lofberg, R., Modigliani, R., Present, D.H., Rutgeerts, P., Scholmerich, J., Stange, E.F., and Sutherland, L.R. (2002) A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology* **122**: 512-530.
- Sandborn, W.J., and Hanauer, S.B. (2002) Infliximab in the treatment of Crohn's disease: a user's guide for clinicians. *Am J Gastroenterol* **97**: 2962-2972.
- Sandborn, W.J., Hanauer, S.B., Rutgeerts, P., Fedorak, R.N., Lukas, M., MacIntosh, D.G., Panaccione, R., Wolf, D., Kent, J.D., Bittle, B., Li, J., and Pollack, P.F. (2007) Adalimumab for maintenance treatment of Crohn's disease: results of the CLASSIC II trial. *Gut* **56**: 1232-1239.
- Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Fedorak, R.N., Scherl, E., Fleisher, M.R., Katz, S., Johanns, J., Blank, M., and Rutgeerts, P. (2008) A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology* **135**: 1130-1141.
- Sandlin, R.C., Goldberg, M.B., and Maurelli, A.T. (1996) Effect of O side-chain length and composition on the virulence of *Shigella flexneri* 2a. *Mol Microbiol* **22**: 63-73.
- Sansonetti, P.J., and Phalipon, A. (1999) M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin Immunol* **11**: 193-203.





- Sartor, R.B. (1995) Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am* **24**: 475-507.
- Sartor, R.B. (2004) Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* **126**: 1620-1633.
- Sartor, R.B. (2005) Does *Mycobacterium avium* subspecies Paratuberculosis cause Crohn's disease? *Gut* **54**: 896-898.
- Sasaki, M., Sitaraman, S.V., Babbin, B.A., Gerner-Smidt, P., Ribot, E.M., Garrett, N., Alpern, J.A., Akyildiz, A., Theiss, A.L., Nusrat, A., and Klapproth, J.M. (2007) Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest* **87**: 1042-1054.
- Savage, D.C. (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* **31**: 107-133.
- Savolainen, K., Kotti, T.J., Schmitz, W., Savolainen, T.I., Sormunen, R.T., Ilves, M., Vainio, S.J., Conzelmann, E., and Hiltunen, J.K. (2004) A mouse model for *alpha-methylacyl-CoA racemase* deficiency: adjustment of bile acid synthesis and intolerance to dietary methyl-branched lipids. *Hum Mol Genet* **13**: 955-965.
- Schembri, M.A., Sokurenko, E.V., and Klemm, P. (2000) Functional flexibility of the FimH adhesin: insights from a random mutant library. *Infect Immun* **68**: 2638-2646.
- Schmid, D., and Munz, C. (2007a) Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* **27**: 11-21.
- Schmid, D., and Munz, C. (2007b) Immune surveillance via self digestion. *Autophagy* **3**: 133-135.
- Schmitt, C.K., Ikeda, J.S., Darnell, S.C., Watson, P.R., Bispham, J., Wallis, T.S., Weinstein, D.L., Metcalf, E.S., and O'Brien, A.D. (2001) Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. *Infect Immun* **69**: 5619-5625.
- Schooling, S.R., and Beveridge, T.J. (2006) Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol* **188**: 5945-5957.
- Schreiber, S., Nikolaus, S., and Hampe, J. (1998) Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* **42**: 477-484.
- Schultsz, C., Moussa, M., van Ketel, R., Tytgat, G.N., and Dankert, J. (1997) Frequency of pathogenic and enteroadherent *Escherichia coli* in patients with inflammatory bowel disease and controls. *J Clin Pathol* **50**: 573-579.
- Schultz, M., Tonkonogy, S.L., Sellon, R.K., Veltkamp, C., Godfrey, V.L., Kwon, J., Grenther, W.B., Balish, E., Horak, I., and Sartor, R.B. (1999) IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *Am J Physiol* **276**: G1461-1472.
- Schwartz, D.A., Pemberton, J.H., and Sandborn, W.J. (2001) Diagnosis and treatment of perianal fistulas in Crohn disease. *Ann Intern Med* **135**: 906-918.
- Sechi, L.A., Gazouli, M., Ikonopoulou, J., Lukas, J.C., Scanu, A.M., Ahmed, N., Fadda, G., and Zanetti, S. (2005a) *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis, genetic susceptibility to Crohn's disease, and Sardinians: the way ahead. *J Clin Microbiol* **43**: 5275-5277.
- Sechi, L.A., Scanu, A.M., Molicotti, P., Cannas, S., Mura, M., Dettori, G., Fadda, G., and Zanetti, S. (2005b) Detection and Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies Paratuberculosis from intestinal mucosal biopsies of patients with and without Crohn's disease in Sardinia. *Am J Gastroenterol* **100**: 1529-1536.
- Seder, R.A. (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol* **94**: 1195-1202.



- Seibold, F., Konrad, A., Flogerzi, B., Seibold-Schmid, B., Arni, S., Juliger, S., and Kun, J.F. (2004) Genetic variants of the mannan-binding lectin are associated with immune reactivity to mannans in Crohn's disease. *Gastroenterology* **127**: 1076-1084.
- Seibold, F. (2005) ASCA: genetic marker, predictor of disease, or marker of a response to an environmental antigen? *Gut* **54**: 1212-1213.
- Seibold, F., Boldt, A.B., Seibold-Schmid, B., Schoepfer, A.M., Flogerzi, B., Muller, S., and Kun, J.F. (2007) Association of deficiency for mannan-binding lectin with anti-mannan antibodies in Crohn's disease: a family study. *Inflamm Bowel Dis* **13**: 1077-1082.
- Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., and Dore, J. (2003) Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* **52**: 237-242.
- Seksik, P., Lepage, P., de la Cochetiere, M.F., Bourreille, A., Sutren, M., Galmiche, J.P., Dore, J., and Marteau, P. (2005) Search for localized dysbiosis in Crohn's disease ulcerations by temporal temperature gradient gel electrophoresis of 16S rRNA. *J Clin Microbiol* **43**: 4654-4658.
- Selby, W., Pavli, P., Crotty, B., Florin, T., Radford-Smith, G., Gibson, P., Mitchell, B., Connell, W., Read, R., Merrett, M., Ee, H., and Hetzel, D. (2007) Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology* **132**: 2313-2319.
- Sellon, R.K., Tonkonogy, S., Schultz, M., Dieleman, L.A., Grenther, W., Balish, E., Rennick, D.M., and Sartor, R.B. (1998) Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* **66**: 5224-5231.
- Sendid, B., Colombel, J.F., Jacquinet, P.M., Faille, C., Fruit, J., Cortot, A., Lucidarme, D., Camus, D., and Poulain, D. (1996) Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's disease. *Clin Diagn Lab Immunol* **3**: 219-226.
- Seow, C.H., Stempak, J.M., Xu, W., Lan, H., Griffiths, A.M., Greenberg, G.R., Steinhart, A.H., Dotan, N., and Silverberg, M.S. (2009) Novel anti-glycan antibodies related to inflammatory bowel disease diagnosis and phenotype. *Am J Gastroenterol* **104**: 1426-1434.
- Sghir, A., Gramet, G., Suau, A., Rochet, V., Pochart, P., and Dore, J. (2000) Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2263-2266.
- Shanahan, F., and O'Mahony, J. (2005) The mycobacteria story in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **100**: 1537-1538.
- Sherwood, L. (2006) Physiologie humaine. *de boeck*, 2ème édition.
- Shin, S., and Park, C. (1995) Modulation of flagellar expression in *Escherichia coli* by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR. *J Bacteriol* **177**: 4696-4702.
- Shivananda, S., Lennard-Jones, J., Logan, R., Fear, N., Price, A., Carpenter, L., and van Blankenstein, M. (1996) Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* **39**: 690-697.
- Shomer, N.H., Dangler, C.A., Schrenzel, M.D., and Fox, J.G. (1997) *Helicobacter bilis*-induced inflammatory bowel disease in scid mice with defined flora. *Infect Immun* **65**: 4858-4864.
- Simms, L.A., Doecke, J.D., Walsh, M.D., Huang, N., Fowler, E.V., and Radford-Smith, G.L. (2008) Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* **57**: 903-910.



- Simons, R.W., Houtman, F., and Kleckner, N. (1987) Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**: 85-96.
- Simpson, K.W., Dogan, B., Rishniw, M., Goldstein, R.E., Klaessig, S., McDonough, P.L., German, A.J., Yates, R.M., Russell, D.G., Johnson, S.E., Berg, D.E., Harel, J., Bruant, G., McDonough, S.P., and Schukken, Y.H. (2006) Adherent and invasive *Escherichia coli* is associated with granulomatous colitis in boxer dogs. *Infect Immun* **74**: 4778-4792.
- Singh, S.B., Davis, A.S., Taylor, G.A., and Deretic, V. (2006) Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* **313**: 1438-1441.
- Sintim, H.O., Smith, J.A., Wang, J., Nakayama, S., and Yan, L. (2010) Paradigm shift in discovering next-generation anti-infective agents: targeting quorum sensing, c-di-GMP signaling and biofilm formation in bacteria with small molecules. *Future Med Chem* **2**: 1005-1035.
- Sokol, H., Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Lay, C., Lepage, P., Podglajen, I., Marteau, P., and Dore, J. (2006) Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **12**: 106-111.
- Sokol, H., Lay, C., Seksik, P., and Tannock, G.W. (2008a) Analysis of bacterial bowel communities of IBD patients: what has it revealed? *Inflamm Bowel Dis* **14**: 858-867.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L.G., Gratadoux, J.J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottiere, H.M., Dore, J., Marteau, P., Seksik, P., and Langella, P. (2008b) *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 16731-16736.
- Sokurenko, E.V., Courtney, H.S., Ohman, D.E., Klemm, P., and Hasty, D.L. (1994) FimH family of type 1 fimbrial adhesins: functional heterogeneity due to minor sequence variations among fimH genes. *J Bacteriol* **176**: 748-755.
- Spivak, J., Landers, C.J., Vasilias, E.A., Abreu, M.T., Dubinsky, M.C., Papadakis, K.A., Ippoliti, A., Targan, S.R., and Fleshner, P.R. (2006) Antibodies to I2 predict clinical response to fecal diversion in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **12**: 1122-1130.
- Spor, A., Koren, O., and Ley, R. (2011) Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol* **9**: 279-290.
- Standaert-Vitse, A., Jouault, T., Vandewalle, P., Mille, C., Seddik, M., Sendid, B., Mallet, J.M., Colombel, J.F., and Poulain, D. (2006) *Candida albicans* is an immunogen for anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody markers of Crohn's disease. *Gastroenterology* **130**: 1764-1775.
- Standaert-Vitse, A., Sendid, B., Joossens, M., Francois, N., Vandewalle-El Khoury, P., Branche, J., Van Kruiningen, H., Jouault, T., Rutgeerts, P., Gower-Rousseau, C., Libersa, C., Neut, C., Broly, F., Chamailard, M., Vermeire, S., Poulain, D., and Colombel, J.F. (2009) *Candida albicans* colonization and ASCA in familial Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **104**: 1745-1753.
- Stange, E.F., Schmid, M., Fellermann, K., and Wehkamp, J. (2005) [Chronic inflammatory bowel diseases (IBD): novel pathophysiological concepts and their clinical relevance]. *Praxis (Bern 1994)* **94**: 1429-1432.
- Stange, E.F., Travis, S.P., Vermeire, S., Beglinger, C., Kupcinkas, L., Geboes, K., Barakauskiene, A., Villanacci, V., Von Herbay, A., Warren, B.F., Gasche, C., Tilg, H., Schreiber, S.W., Scholmerich, J., and Reinisch, W. (2006) European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* **55 Suppl 1**: i1-15.
- Stanley, T.L., Ellermeier, C.D., and Schlauch, J.M. (2000) Tissue-specific gene expression identifies a gene in the lysogenic phage Gifsy-1 that affects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium survival in Peyer's patches. *J Bacteriol* **182**: 4406-4413.



- Steinhart, A.H., Feagan, B.G., Wong, C.J., Vandervoort, M., Mikolainis, S., Croitoru, K., Seidman, E., Leddin, D.J., Bitton, A., Drouin, E., Cohen, A., and Greenberg, G.R. (2002) Combined budesonide and antibiotic therapy for active Crohn's disease: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* **123**: 33-40.
- Stensrud, K.F., Adam, P.R., La Mar, C.D., Olive, A.J., Lushington, G.H., Sudharsan, R., Shelton, N.L., Givens, R.S., Picking, W.L., and Picking, W.D. (2008) Deoxycholate interacts with IpaD of *Shigella flexneri* in inducing the recruitment of IpaB to the type III secretion apparatus needle tip. *J Biol Chem* **283**: 18646-18654.
- Sternberg, S.S. (1992) Histology for pathologists. *New York : Raven Press*.
- Strober, W., Fuss, I.J., and Blumberg, R.S. (2002) The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* **20**: 495-549.
- Strober, W., and Fuss, I.J. (2011) Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **140**: 1756-1767.
- Su, C.G., Judge, T.A., and Lichtenstein, G.R. (2002) Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* **31**: 307-327.
- Subramanian, S., Roberts, C.L., Hart, C.A., Martin, H.M., Edwards, S.W., Rhodes, J.M., and Campbell, B.J. (2008) Replication of Colonic Crohn's Disease Mucosal *Escherichia coli* Isolates within Macrophages and Their Susceptibility to Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 427-434.
- Sundberg, J.P., Elson, C.O., Bedigian, H., and Birkenmeier, E.H. (1994) Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology* **107**: 1726-1735.
- Sura, R., Colombel, J.F., and Van Kruiningen, H.J. (2011) Lymphatics, tertiary lymphoid organs and the granulomas of Crohn's disease: an immunohistochemical study. *Aliment Pharmacol Ther* **33**: 930-939.
- Surette, M.G., Miller, M.B., and Bassler, B.L. (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1639-1644.
- Sutton, C.L., Kim, J., Yamane, A., Dalwadi, H., Wei, B., Landers, C., Targan, S.R., and Braun, J. (2000) Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. *Gastroenterology* **119**: 23-31.
- Suzuki, H., Fukuda, Y., Koizuka, H., Tomita, T., Hori, K., Suzuki, M., and O'Morain, C. (2008) Dietary antigens in Crohn's disease: antibodies to porcine pancreatic amylase. *Am J Gastroenterol* **103**: 656-664.
- Suzuki, T., Yoshikawa, Y., Ashida, H., Iwai, H., Toyotome, T., Matsui, H., and Sasakawa, C. (2006) High vaccine efficacy against shigellosis of recombinant noninvasive *Shigella* mutant that expresses *Yersinia* invasin. *J Immunol* **177**: 4709-4717.
- Svensson, A., Larsson, A., Emtenas, H., Hedenstrom, M., Fex, T., Hultgren, S.J., Pinkner, J.S., Almqvist, F., and Kihlberg, J. (2001) Design and evaluation of pilicides: potential novel antibacterial agents directed against uropathogenic *Escherichia coli*. *Chembiochem* **2**: 915-918.
- Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M., and Lochs, H. (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**: 44-54.
- Swidsinski, A., Weber, J., Loening-Baucke, V., Hale, L.P., and Lochs, H. (2005) Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* **43**: 3380-3389.





- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Theissig, F., Engelhardt, H., Bengmark, S., Koch, S., Lochs, H., and Dorffel, Y. (2007) Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut* **56**: 343-350.
- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., and Herber, A. (2009) Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview. *J Physiol Pharmacol* **60 Suppl 6**: 61-71.
- Tabaqchali, S., O'Donoghue, D.P., and Bettelheim, K.A. (1978) *Escherichia coli* antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **19**: 108-113.
- Takesue, Y., Ohge, H., Uemura, K., Imamura, Y., Murakami, Y., Yokoyama, T., Kakehashi, M., and Sueda, T. (2002) Bacterial translocation in patients with Crohn's disease undergoing surgery. *Dis Colon Rectum* **45**: 1665-1671.
- Tamagawa, H., Hiroi, T., Mizushima, T., Ito, T., Matsuda, H., and Kiyono, H. (2007) Therapeutic effects of roxithromycin in interleukin-10-deficient colitis. *Inflamm Bowel Dis* **13**: 547-556.
- Tamayo, R., Tischler, A.D., and Camilli, A. (2005) The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *J Biol Chem* **280**: 33324-33330.
- Tamboli, C.P., Neut, C., Desreumaux, P., and Colombel, J.F. (2004) Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* **53**: 1-4.
- Targan, S.R., Landers, C.J., Yang, H., Lodes, M.J., Cong, Y., Papadakis, K.A., Vasiliauskas, E., Elson, C.O., and Hershberg, R.M. (2005) Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology* **128**: 2020-2028.
- Tewari, R., MacGregor, J.I., Ikeda, T., Little, J.R., Hultgren, S.J., and Abraham, S.N. (1993) Neutrophil activation by nascent FimH subunits of type 1 fimbriae purified from the periplasm of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**: 3009-3015.
- Thia, K.T., Mahadevan, U., Feagan, B.G., Wong, C., Cockeram, A., Bitton, A., Bernstein, C.N., and Sandborn, W.J. (2009) Ciprofloxacin or metronidazole for the treatment of perianal fistulas in patients with Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Inflamm Bowel Dis* **15**: 17-24.
- Thompson, N.P., Driscoll, R., Pounder, R.E., and Wakefield, A.J. (1996) Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *Bmj* **312**: 95-96.
- Torok, H.P., Glas, J., Tonenchi, L., Bruennler, G., Folwaczny, M., and Folwaczny, C. (2004a) Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. *Gastroenterology* **127**: 365-366.
- Torok, H.P., Glas, J., Tonenchi, L., Mussack, T., and Folwaczny, C. (2004b) Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol* **112**: 85-91.
- Torres, A.G., Lopez-Sanchez, G.N., Milflores-Flores, L., Patel, S.D., Rojas-Lopez, M., Martinez de la Pena, C.F., Arenas-Hernandez, M.M., and Martinez-Laguna, Y. (2007a) Ler and H-NS, regulators controlling expression of the long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **189**: 5916-5928.
- Torres, A.G., Milflores-Flores, L., Garcia-Gallegos, J.G., Patel, S.D., Best, A., La Ragione, R.M., Martinez-Laguna, Y., and Woodward, M.J. (2007b) Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae (LPF) of *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Med Microbiol* **297**: 177-185.
- Torres, A.G., Tutt, C.B., Duval, L., Popov, V., Nasr, A.B., Michalski, J., and Scaletsky, I.C. (2007c) Bile salts induce expression of the afimbrial LDA adhesin of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **9**: 1039-1049.



- Torres, A.G., Slater, T.M., Patel, S.D., Popov, V.L., and Arenas-Hernandez, M.M. (2008) Contribution of the Ler- and H-NS-regulated long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 during binding to tissue-cultured cells. *Infect Immun* **76**: 5062-5071.
- Travassos, L.H., Carneiro, L.A., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.G., Magalhaes, J.G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., Boneca, I.G., Allaoui, A., Jones, N.L., Nunez, G., Girardin, S.E., and Philpott, D.J. (2010) Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* **11**: 55-62.
- Turner, J.R. (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**: 799-809.
- Tysk, C., Lindberg, E., Jarnerot, G., and Floderus-Myrhed, B. (1988) Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* **29**: 990-996.
- Ullman, T.A., and Itzkowitz, S.H. (2011) Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* **140**: 1807-1816.
- Ursing, B., Alm, T., Barany, F., Bergelin, I., Ganrot-Norlin, K., Hoevens, J., Huitfeldt, B., Jarnerot, G., Krause, U., Krook, A., Lindstrom, B., Nordle, O., and Rosen, A. (1982) A comparative study of metronidazole and sulfasalazine for active Crohn's disease: the cooperative Crohn's disease study in Sweden. II. Result. *Gastroenterology* **83**: 550-562.
- Van Kruiningen, H.J., Civco, I.C., and Cartun, R.W. (2005) The comparative importance of *E. coli* antigen in granulomatous colitis of Boxer dogs. *Apmis* **113**: 420-425.
- Van Kruiningen, H.J., Poulin, M., Garmendia, A.E., Desreumaux, P., Colombel, J.F., De Hertogh, G., Geboes, K., Vermeire, S., and Tsongalis, G.J. (2007) Search for evidence of recurring or persistent viruses in Crohn's disease. *Apmis* **115**: 962-968.
- Vejborg, R.M., Hancock, V., Petersen, A.M., Krogfelt, K.A., and Klemm, P. (2011) Comparative genomics of *Escherichia coli* isolated from patients with inflammatory bowel disease. *BMC Genomics* **12**: 316.
- Vidal, J.E., Ludewick, H.P., Kunkel, R.M., Zahner, D., and Klugman, K.P. (2011) The LuxS-Dependent Quorum-Sensing System Regulates Early Biofilm Formation by *Streptococcus pneumoniae* Strain D39. *Infect Immun* **79**: 4050-4060.
- Wai, S.N., Takade, A., and Amako, K. (1995) The release of outer membrane vesicles from the strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol* **39**: 451-456.
- Wai, S.N., Lindmark, B., Soderblom, T., Takade, A., Westermarck, M., Oscarsson, J., Jass, J., Richter-Dahlfors, A., Mizunoe, Y., and Uhlin, B.E. (2003) Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell* **115**: 25-35.
- Wakefield, A.J., Pittilo, R.M., Sim, R., Cosby, S.L., Stephenson, J.R., Dhillon, A.P., and Pounder, R.E. (1993) Evidence of persistent measles virus infection in Crohn's disease. *J Med Virol* **39**: 345-353.
- Walker, A.W., Sanderson, J.D., Churcher, C., Parkes, G.C., Hudspith, B.N., Rayment, N., Brostoff, J., Parkhill, J., Dougan, G., and Petrovska, L. (2011) High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol* **11**: 7.
- Wang, Y., Nordhues, B.A., Zhong, D., and De Guzman, R.N. (2010) NMR characterization of the interaction of the *Salmonella* type III secretion system protein SipD and bile salts. *Biochemistry* **49**: 4220-4226.
- Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P.J., and Strober, W. (2004) NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* **5**: 800-808.
- Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P.J., Wakatsuki, Y., Fuss, I.J., and Strober, W. (2006) Nucleotide binding oligomerization domain 2 deficiency leads to dysregulated TLR2 signaling and induction of antigen-specific colitis. *Immunity* **25**: 473-485.



- Watanabe, T., Asano, N., Murray, P.J., Ozato, K., Taylor, P., Fuss, I.J., Kitani, A., and Strober, W. (2008) Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest* **118**: 545-559.
- Waters, C.M., Lu, W., Rabinowitz, J.D., and Bassler, B.L. (2008) Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of *vpsT*. *J Bacteriol* **190**: 2527-2536.
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schaffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., Schroder, J.M., Bevins, C.L., Fellermann, K., and Stange, E.F. (2004) NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* **53**: 1658-1664.
- Wehkamp, J., Salzman, N.H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R.E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., Feathers, R.W., Chu, H., Lima, H., Jr., Fellermann, K., Ganz, T., Stange, E.F., and Bevins, C.L. (2005) Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 18129-18134.
- Wehkamp, J., Stange, E.F., and Fellermann, K. (2009) Defensin-immunology in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin Biol* **33 Suppl 3**: S137-144.
- Wei, B., Huang, T., Dalwadi, H., Sutton, C.L., Bruckner, D., and Braun, J. (2002) *Pseudomonas fluorescens* encodes the Crohn's disease-associated I2 sequence and T-cell superantigen. *Infect Immun* **70**: 6567-6575.
- Wellcome (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* **447**: 661-678.
- Wen, L., Ley, R.E., Volchkov, P.Y., Stranges, P.B., Avanesyan, L., Stonebraker, A.C., Hu, C., Wong, F.S., Szot, G.L., Bluestone, J.A., Gordon, J.I., and Chervonsky, A.V. (2008) Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* **455**: 1109-1113.
- Wensink, J., and Witholt, B. (1981) Outer-membrane vesicles released by normally growing *Escherichia coli* contain very little lipoprotein. *Eur J Biochem* **116**: 331-335.
- Whitehead, R. (1997) Mucosal biopsy of the gastrointestinal tract. 5ème édition, New York : Elsevier.
- Willing, B., Halfvarson, J., Dicksved, J., Rosenquist, M., Jarnerot, G., Engstrand, L., Tysk, C., and Jansson, J.K. (2009) Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **15**: 653-660.
- Willing, B.P., Dicksved, J., Halfvarson, J., Andersson, A.F., Lucio, M., Zheng, Z., Jarnerot, G., Tysk, C., Jansson, J.K., and Engstrand, L. (2010) A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology* **139**: 1844-1854 e1841.
- Wold, A.E., Mestecky, J., Tomana, M., Kobata, A., Ohbayashi, H., Endo, T., and Eden, C.S. (1990) Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin. *Infect Immun* **58**: 3073-3077.
- Wu, F., Guo, N.J., Tian, H., Marohn, M., Gearhart, S., Bayless, T.M., Brant, S.R., and Kwon, J.H. (2010a) Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **17**: 241-250.
- Wu, F., Zhang, S., Dassopoulos, T., Harris, M.L., Bayless, T.M., Meltzer, S.J., Brant, S.R., and Kwon, J.H. (2010b) Identification of microRNAs associated with ileal and colonic Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **16**: 1729-1738.
- Wu, J., and Kaufman, R.J. (2006) From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ* **13**: 374-384.

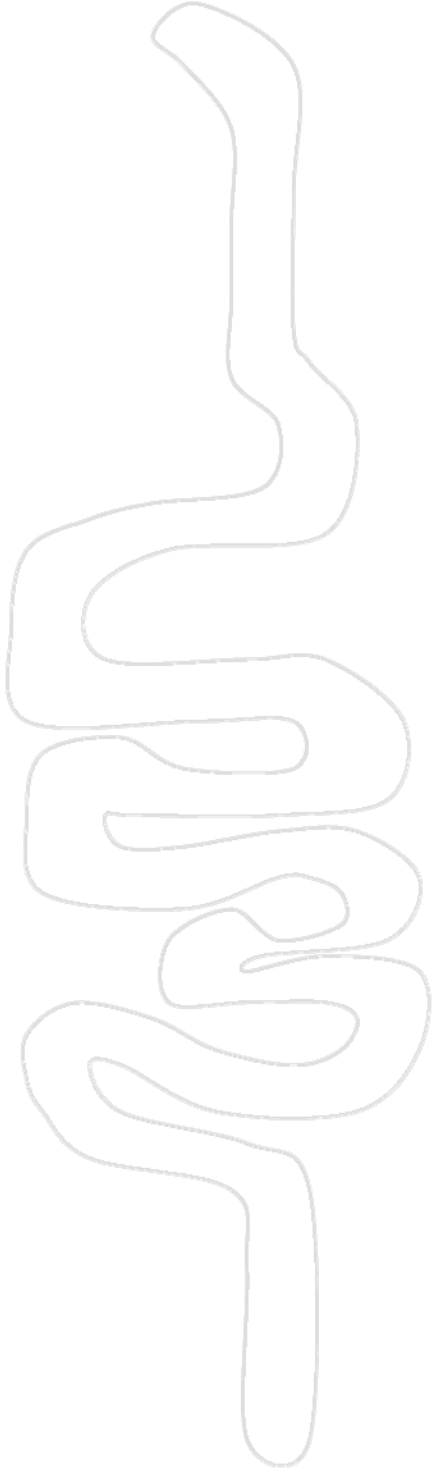


- Xavier, R.J., and Podolsky, D.K. (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**: 427-434.
- Yang, S.K., Loftus, E.V., Jr., and Sandborn, W.J. (2001) Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Inflamm Bowel Dis* **7**: 260-270.
- Yao, R., Burr, D.H., Doig, P., Trust, T.J., Niu, H., and Guerry, P. (1994) Isolation of motile and non-motile insertional mutants of *Campylobacter jejuni*: the role of motility in adherence and invasion of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **14**: 883-893.
- Young, B.M., and Young, G.M. (2002) YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **184**: 1324-1334.
- Young, G.M., Schmiel, D.H., and Miller, V.L. (1999) A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6456-6461.
- Young, J.C., and Hartl, F.U. (2003) A stress sensor for the bacterial periplasm. *Cell* **113**: 1-2.
- Zeissig, S., Burgel, N., Gunzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A.J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.D. (2007) 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* **56**: 61-72.
- Zhang, F.R., Huang, W., Chen, S.M., Sun, L.D., Liu, H., Li, Y., Cui, Y., Yan, X.X., Yang, H.T., Yang, R.D., Chu, T.S., Zhang, C., Zhang, L., Han, J.W., Yu, G.Q., Quan, C., Yu, Y.X., Zhang, Z., Shi, B.Q., Zhang, L.H., Cheng, H., Wang, C.Y., Lin, Y., Zheng, H.F., Fu, X.A., Zuo, X.B., Wang, Q., Long, H., Sun, Y.P., Cheng, Y.L., Tian, H.Q., Zhou, F.S., Liu, H.X., Lu, W.S., He, S.M., Du, W.L., Shen, M., Jin, Q.Y., Wang, Y., Low, H.Q., Erwin, T., Yang, N.H., Li, J.Y., Zhao, X., Jiao, Y.L., Mao, L.G., Yin, G., Jiang, Z.X., Wang, X.D., Yu, J.P., Hu, Z.H., Gong, C.H., Liu, Y.Q., Liu, R.Y., Wang, D.M., Wei, D., Liu, J.X., Cao, W.K., Cao, H.Z., Li, Y.P., Yan, W.G., Wei, S.Y., Wang, K.J., Hibberd, M.L., Yang, S., Zhang, X.J., and Liu, J.J. (2009) Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med* **361**: 2609-2618.
- Zhou, L., Srisatjaluk, R., Justus, D.E., and Doyle, R.J. (1998) On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **163**: 223-228.
- Zippi, M., Colaiacomo, M.C., Marcheggiano, A., Pica, R., Paoluzi, P., Iaiani, G., Caprilli, R., and Maccioni, F. (2006) Mesenteric adenitis caused by *Yersinia pseudotuberculosis* in a patient subsequently diagnosed with Crohn's disease of the terminal ileum. *World J Gastroenterol* **12**: 3933-3935.
- Zucchelli, M., Torkvist, L., Bresso, F., Halfvarson, J., Hellquist, A., Anedda, F., Assadi, G., Lindgren, G.B., Svanfeldt, M., Janson, M., Noble, C.L., Pettersson, S., Lappalainen, M., Paavola-Sakki, P., Halme, L., Farkkila, M., Turunen, U., Satsangi, J., Kontula, K., Lofberg, R., Kere, J., and D'Amato, M. (2009) PepT1 oligopeptide transporter (SLC15A1) gene polymorphism in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **15**: 1562-1569.





# ANNEXES





*Annexe n°1*

The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases

**Chassaing B.**, Darfeuille-Michaud A.

*Gastroenterology*, 2011;140:1720-1728.



# The Commensal Microbiota and Enteropathogens in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases

Benoit Chassaing<sup>\*,‡,§</sup>Arlette Darfeuille-Michaud<sup>\*,‡,§</sup>

<sup>\*</sup>Clermont Université, Université d'Auvergne, Jeune Equipe JE 2526, Clermont-Ferrand; <sup>‡</sup>Institut Universitaire de Technologie, Université d'Auvergne, Aubière; and <sup>§</sup>Institut National de Recherche Agronomique, Unité Sous Contrat 2018, Clermont-Ferrand, France

**Intestinal inflammation arises from abnormal host-microbe interactions. The perturbations of homeostatic coexistence involve host genetic factors, barrier function, innate and adaptive immunity, as well as qualitative and quantitative changes in the composition of the microbiota. Dysbiosis toward selected micro-organisms and decreased complexity of commensal bacteria have been observed in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis, but it is not clear whether the dysbiosis contributes to development of inflammatory bowel disease or is instead a consequence of the disease. Pathogens with virulence factors that allow them to breach the intestinal barrier and induce chronic inflammation might mediate the pathogenesis of these diseases. To identify new therapeutic approaches for inflammatory bowel disease, it is important to identify host susceptibility factors involved in the control of microbial infection, characterize potential pathogens, and eliminate them or block the expression of their virulence factors.**

**Keywords:** Inflammatory Bowel Disease; Microbiota; Commensal; Enteropathogens; Adherent-Invasive *Escherichia coli*.

Evidence from immunologic, microbiologic, and genetic studies implicates abnormal host-microbial interactions in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases (IBD) (for reviews, see Xavier et al<sup>1</sup> and Kaser et al<sup>2</sup>). The human gastrointestinal (GI) tract contains as many as 10<sup>14</sup> individual bacteria, comprising over 500 different species. In close contact with the human microbiome, synthesizing about 100 times more proteins than the whole cells of the host,<sup>3–5</sup> is the intestinal mucosa that plays a central role in host-commensal flora interactions, serving as a primary barrier between the immune

system and the external environment. To accommodate colonization by very complex symbiotic bacterial communities and to retain the capacity to fight pathogens, the immune system has evolved, and any perturbation of homeostatic coexistence between microbiota and the host is likely to be involved in exacerbated inflammation.<sup>6</sup>

Development of culture-independent methods to define the composition of the intestinal microbiota revealed the role of the microbiota in the pathogenesis of IBD—the bacterial flora differs between patients with IBD and healthy individuals. In parallel, studies of animal models demonstrated the role of intestinal microbiota regarding its qualitative and/or quantitative composition in the onset of intestinal inflammation. We have advanced our understanding of the genetics of IBD, identifying genes associated with susceptibility to Crohn's disease (CD) that regulate the innate immune response, the mucosal barrier, and the bacterial killing of intracellular pathogens.

## The Intestinal Microbiota in the Pathogenesis of IBD

Studies of experimental models have shown that the intestinal microbiota can play a major role in the

**Abbreviations used in this paper:** AIEC, adherent-invasive *Escherichia coli*; Ang4, angiogenin 4; ASCA, Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies; ATG16L1, autophagy related protein 16-like 1; CEACAM6, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6; ER, endoplasmic reticulum; IFN, interferon; IL, interleukin; IRGM, immunity-related GTPase family M; MAP, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis; NOD2, Nucleotide oligomerization domain 2; PCR, polymerase chain reaction; SFB, segmented filamentous bacteria; Th, T helper cells; TNF, tumor necrosis factor; XBP-1, X-box binding protein 1.



**Table 1.** Arguments in Favor of the Involvement of Intestinal Microbiota in the Etiopathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases in Humans

Data highlighting the involvement of intestinal microbiota in IBD	Disease	References
Fecal stream diversion prevents recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum	CD	8
Reinfusion of luminal contents into bypassed colonic segments rapidly results in recurrent disease	CD	7
Antibiotic therapy with metronidazole, ciprofloxacin, or rifaximin were associated with clinical improvement in patients with IBD	CD (including perianal or fistulous disease), UC, and pouchitis	76, 107–109
Higher level of serum reactivity toward microbial antigens	CD	9,12
Mucosal barrier defects	CD	43–45
Increased bacterial translocation	CD	46
Altered intestinal mucus barrier	UC	48
Increased number of colon-associated mucolytic bacteria ( <i>Ruminococcus gnavus</i> and <i>torques</i> )	CD and UC	26,29,38
Higher concentrations of mucus- or mucosal-associated bacteria ( $\gamma$ -proteobacteria, actinobacteria, and bifidobacteria)	CD and UC	21,25,37
Higher concentrations of mucosal- and intraepithelial-associated bacteria	CD	17,18,24,31–37
Decrease in microbiota biodiversity observable in mucosa-associated microbiota and/or in feces	CD and UC	19–24,26
Decrease in Feacalibacteria ( <i>Feacalibacterium prausnitzii</i> ) in mucosa-associated microbiota or fecal samples	CD and UC	20,21,26,28,32
Decreased antimicrobial peptides secretion leading to overgrowth, increased mucosal adherence, and translocation of commensal bacteria.	UC and CD	52,53
Polymorphisms of CD-susceptibility genes involved in the killing of intracellular bacteria and/or antimicrobial peptide secretion by Paneth cells ( <i>NOD2</i> , <i>ATG16L1</i> , <i>IRGM</i> )	CD	62,63,66–69
Polymorphism of the IBD-susceptibility gene <i>Xbp1</i> involved in ER stress and antimicrobial peptides secretion by Paneth cells	CD and UC	19

development of chronic inflammation (see [Supplementary Table 1](#)). In humans, the first demonstrations of the involvement of intestinal microbiota in IBD came from clinical experiments showing that diversion of the fecal stream improved symptoms of CD and that postoperative exposure of the terminal ileum to luminal contents increased inflammation<sup>7,8</sup> ([Table 1](#)). Patients with IBD (particularly those with CD) have antibodies against microbial antigens such as *Saccharomyces cerevisiae* oligomannan (anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies [ASCA]), *Escherichia coli* outer membrane porin C (OmpC), and *Pseudomonas fluorescens* I2 sequence; patients with the highest levels of serum reactivity toward larger numbers of microbial antigens have the greatest frequency of strictures, internal perforations, and small bowel surgery.<sup>9</sup> ASCAs are present in 50%–60% of patients with CD, although it is not clear how production of these antibodies is induced because they could originate from epitopes on the surface of other micro-organisms, such as *Candida albicans*.<sup>10</sup>

Inflammation might arise from lack of tolerance to antigens present in autologous microflora; cells derived from inflamed intestinal tissues of patients with IBD are activated by exposure to sonicated samples of autologous or heterologous GI microflora, whereas cells from normal individuals respond only to sonicates of heterologous microflora.<sup>11</sup> An overly aggressive T cell-mediated response might be induced by specific micro-organisms. Bacterial flagellin that is a dominant antigen in CD, but not in ulcerative colitis (UC), activates innate immunity

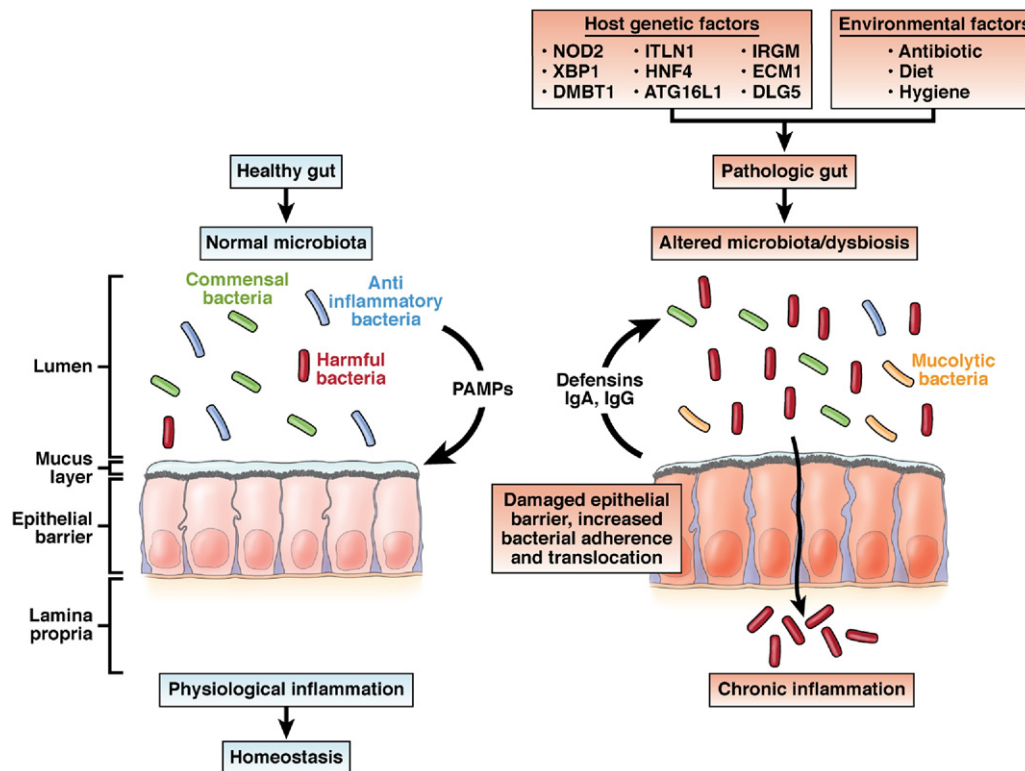
via Toll-like receptor (TLR) 5, and flagellin-specific CD4+ T cells induced severe colitis upon adoptive transfer to naive SCID mice.<sup>12</sup> Differentiation of T helper (Th) 17 cells—Th17 and Th1 cells being important mediators of inflammation—correlated with the presence of Cytophaga-Flavobacter-Bacteroidetes bacteria in the intestine of mice, independently of TLR, interleukin (IL)-21, or IL-23 signaling.<sup>13</sup> Monocolonization of the small intestine of mice with segmented filamentous bacterium (SFB), a commensal microbe, is sufficient to induce the appearance of Th17 cells in the lamina propria,<sup>14,15</sup> and Th17 cell differentiation was inhibited in mice given selective antibiotics. In addition, mice that lacked Th17 cells acquired them after introduction of gut bacteria from Th17 cell-sufficient mice. Although SFB appear to help shape the GI immune system, their role in inflammation in patients with IBD is not clear. Few studies have reported the presence of SFB in humans, and there are no data concerning IBD patients. Although it is clear that Th17 cells induce tissue inflammation in autoimmune disease, their role in host defense reactions and clearing pathogens require further studies.<sup>16</sup>

### Dysbiosis in Patients With IBD

Culture-dependent and -independent analyses of mucosal-associated and fecal bacteria revealed that patients with IBD have less complex profiles of commensal bacteria and higher numbers of mucosa-associated bacteria<sup>17–26</sup> than healthy individuals. The microbiota is re-







**Figure 1.** The microbiota and host genetic and environmental factors contribute to pathogenesis of Crohn's disease. (*Left panel*) In healthy individuals, commensal and anti-inflammatory bacteria interact with the GI mucosa to maintain homeostasis. This involves recognition of pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) derived from microbes by intestinal mucosa and a physiologic host response involving IgA and IgG and  $\alpha$ - and  $\beta$ -defensins. The microbial community prevents the proinflammatory effects of harmful bacteria that are present and mediate tolerance. (*Right panel*) In patients with IBD, abnormal interaction between host cells and microbes perturb homeostasis, leading to intestinal inflammation. Inflammation could arise from host genetic factors that affect barrier functions, innate and adaptive immunity, and qualitative and/or quantitative changes in the composition of the microbiota.

modelled during the active phase of CD, with the equilibrium leaning toward dominant phylogenetic groups, perhaps as a consequence of inflammation.<sup>27</sup> Patients with IBD, compared with healthy controls, have fewer bacteria with anti-inflammatory properties and/or more bacteria with proinflammatory properties (Figure 1). Several metagenomic-based studies reported that members of the phyla Bacteroidetes and Firmicutes were reduced in patients with CD or UC.<sup>20,21,28,29</sup> Reduced numbers of *Bacteroides fragilis* might contribute to inflammation because this prominent human symbiont has protective effects: it protects mice from colitis induction by *Helicobacter hepaticus*, a murine commensal bacterium with pathogenic properties.<sup>30</sup> Among Firmicutes, *Faecalibacterium prausnitzii* has anti-inflammatory properties; its numbers are reduced in patients with CD and associated with risk of postresection recurrence of ileal CD.<sup>28</sup>

In contrast, a greater relative abundance in Enterobacteriaceae, mostly *Escherichia coli*, was observed in CD patients, more notably on mucosa-associated microbiota than in fecal samples.<sup>17,18,24,31–35</sup> Intestinal colonization by *E coli* correlates with bacterial adhesion of CD-associated *E coli* strains to intestinal epithelial cells.<sup>31,36</sup> Microbial analyses of CD specimens could indicate that the

ratio of *F Prausnitzii/E coli* should be used to evaluate the level of the dysbiosis in IBD patients and identify those at high risk for recurrence of CD. In addition, fluorescent in situ hybridization analyses showed the presence of bacteria that penetrate the mucus layer in 30% of mucosal biopsy specimens from patients with IBD, compared with 3% of mucosal biopsies from healthy controls,<sup>37</sup> indicating that the microbiota might have closer contact with the mucosa of IBD patients. This might result from the increased numbers of some mucolytic bacteria, such as *Ruminococcus gnavus* and *Ruminococcus torques*, observed in macroscopically and histologically normal colonic epithelium from patients with colonic CD and UC.<sup>38</sup>

There might be multiple origins of the dysbiosis observed in patients with IBD. Dysregulation of adaptive and innate immunity can induce dysbiosis. In mice, loss of the transcription factor T-bet, which initiates lineage development of Th1 cells, causes bacterial populations to become colitogenic; this selected community of bacteria promotes intestinal inflammation upon transfer into immunosufficient mice that express T-bet. Colitis can therefore be induced in wild-type mice by a selected population of bacteria.<sup>39</sup> Dysbiosis can also arise from dense bacteriophage communities specifically associated with



the GI mucosa, as observed in CD patients.<sup>40</sup> Bacteriophage can directly destabilize bacterial communities or interfere with microbe-associated molecular patterns on bacterial surfaces by steric competition.

The dysbiosis observed in IBD patients, with subsequent disruption of the intestinal microbiota community, might arise from colonization by an enteric pathogen, from host-mediated inflammatory responses, or from a combination of these. Pathogens could subvert the inflammatory response and then take advantage of inflammation to breach the barrier effect imposed by the resident microbiota and the intestinal mucosa itself. Inflammatory host responses induced by *Salmonella* Typhimurium in mice change the composition of the microbiota and promote its own growth.<sup>41</sup> In addition, comparison of *Citrobacter jejuni* infection and dextran sulfate sodium-induced colitis in mice revealed that the total number of colonic bacteria decreased slightly during noninflammatory infection with *C jejuni*, but that dextran sulfate sodium-induced inflammation promoted overgrowth of *Enterobacteriaceae* and that both conditions were necessary to reach maximal dysbiosis.<sup>42</sup>

### Host Factors That Affect Commensal Bacteria in IBD

Patients with CD and their relatives have increased intestinal permeability, which could reflect mucosal barrier defects that promote bacterial translocation through the intestinal mucosa. The intestinal defect was first reported in studies showing that the intestinal mucosa of patients with CD had a decreased ability to exclude large molecules.<sup>43</sup> The barrier dysfunctions observed in patients with mild to moderately active CD result mostly from up-regulation of claudin 2 (which forms pores) and down-regulation and redistribution of claudins 5 and 8 (which seal the barrier), leading to discontinuous tight junctions.<sup>44,45</sup> However, the association between reduced expression of junction molecules and the inflammatory process is not clear. Patients with ileal CD were reported to have defects of the follicle-associated epithelium barrier that overlies the Peyer's patches, leading to an increased load of commensal bacteria at the inductive sites of mucosal immunity.<sup>46,47</sup> The intestinal mucus barrier is significantly altered in UC patients, particularly in mucus composition and concentration in phospholipids.<sup>48</sup> Aberrant mucin assembly causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation that resembles UC in mice<sup>49,50</sup>; defects in the mucus layer could also influence the pattern of microbial colonization and the maintenance of microbial community structure and function.

Altered function of defensins—antimicrobial peptides with bactericidal activities—might also be involved in IBD. Decreased defensin levels can lead to a weakened intestinal barrier function to intestinal microbes and might mediate the pathophysiology of chronic inflam-

mation. Ileal CD is associated with reduced expression of  $\alpha$ -defensin in Paneth cells; colonic CD is associated with reduced expression of  $\beta$ -defensin by enterocytes.<sup>51-53</sup> Changes of intestinal microbiota were observed in mice that express the human  $\alpha$ -defensin 5 and also in mice that do not produce functional  $\alpha$ -defensins.<sup>54</sup> Other secreted proteins, such as RegIII $\gamma$  (a C-type lectin) and angiogenin 4 (Ang4), have potent antimicrobial activity, and their expression is induced in the mucosa in response to contact with commensal bacteria.<sup>55,56</sup> By inhibiting the access of microbes to the GI epithelium, Ang4 limits activation of inflammatory responses, and members of the normal microflora, such as *Bacteroides thetaiotaomicron*, are able to up-regulate expression of Ang4.<sup>55</sup> An efficient mucosal barrier therefore depends on the commensal microbiota.

The immunoglobulin (Ig) A response establishes and maintains the noninflammatory relationship between host cells and microbes and is required for local and systemic immune homeostasis.<sup>57-59</sup> All members of the intestinal microbiota are not equally efficient in inducing secretion of IgA. Gram-negative bacteria, such as *Bacteroides*, are more efficient in inducing secretory IgA than gram-positive bacteria such as *Lactobacilli*.<sup>60</sup> The absence of intestinal IgA can result in overgrowth of commensal microbes, such as SFB, as shown in mice. Induction of IgA might therefore affect competition between various members of the microbiota<sup>57</sup>—modifications of IgA-induced secretion could select specific micro-organisms from the commensal microbiota and promote commensal bacteria-induced inflammation.

Genetic studies, in particular genome-wide association studies, have identified mutations that are reproducibly associated with IBD (for reviews, see Kaser et al<sup>2</sup> and Cho<sup>61</sup>). UC and CD have some genetic risk factors in common, but UC is not as heritable as CD. The genetic variants that confer risk to CD indicate the importance of innate immunity, autophagy, and phagocytosis in pathogenesis of CD.<sup>62-67</sup> Polymorphisms in the genes *Nucleotide oligomerization domain 2* (*NOD2*) and *autophagy related protein 16-like 1* (*ATG16L1*) interfere with secretion of antimicrobial peptides by Paneth cells.<sup>68,69</sup> Variants of X-box binding protein 1 (*XBPI*) have been observed in CD and UC patients and associated with the endoplasmic reticulum stress response and defects in Paneth cell function.<sup>49</sup> Patients with mutations in *NOD2*, *ATG16L1*, immunity-related GTPase family M (*IRGM*), and *XBPI* could therefore have altered microbiota compositions that result from defects in expression of defensins. Autophagy is an innate defense mechanism that acts as a cell-autonomous system to eliminate intracellular pathogens. Polymorphisms in *ATG16L1* and *IRGM* involved in autophagy could alter this process and promote multiplication of intracellular bacteria and lead to chronic, uncontrolled inflammation in the intestine (for a review, see Stappenbeck et al<sup>70</sup>). The observation that *NOD2* and



ATG16L1 form a complex at the cytoplasm membrane supports the hypothesis that patients with IBD have defects in autophagy; mutations in NOD2 or autophagy-related proteins result in reduced and ineffective autophagic responses to intracellular pathogens.<sup>71,72</sup>

## GI Enteropathogens in IBD

Searches for organisms that cause IBD, based on Koch's postulate, have not led to the identification of a single pathogen. Consistent with the concept that IBDs are multifactorial diseases, a modified Koch's postulate should be applied to IBD, to take into account the genetic susceptibility of the host. Accumulating data support the notion that, in some IBD patients, it will exist a dysfunctional innate immune response to persistent infection by intracellular bacteria—possibly opportunistic pathogens.

### *Mycobacterium avium* Subspecies paratuberculosis

*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) causes spontaneous granulomatous enterocolitis (Johne's disease) with diarrhea and wasting in ruminants, making this intracellular pathogen a credible etiologic agent of CD.<sup>73</sup> After considerable investigation, the link between MAP and CD remains neither substantiated nor invalidated. Many investigators have measured the MAP-specific insertion element IS900 DNA in the tissue and/or blood of IBD patients using polymerase chain reaction (PCR) analyses with contradictory results (for a review, see Sartor<sup>73</sup>), and 2 recent studies showed no association between MAP and NOD2 mutations.<sup>74,75</sup> A 2-year prospective trial of triple antimycobacterial therapy (clarithromycin, rifabutin, and ethambutol) failed to show sustained clinical response in CD patients.<sup>76</sup> However, the presence of MAP-reactive cells of a Th1 or Th1/Th17 phenotype indicates a role for mycobacteria in the inflammation that develops during CD.<sup>77</sup> MAP was reported to induce experimental colitis in gnotobiotic *IL-10*<sup>-/-</sup> mice.<sup>78</sup> MAP is not likely to cause most cases of CD, but some cases might arise from MAP infections in individuals that have defects in intracellular killing of bacteria, caused by variants in *ATG16L1*, *IGRM*, or *NOD2*. This hypothesis deserves further investigation because functional autophagy limits the growth of intracellular mycobacteria, as shown with *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>79</sup>

### Enteric Pathogens With Intracellular Lifestyle

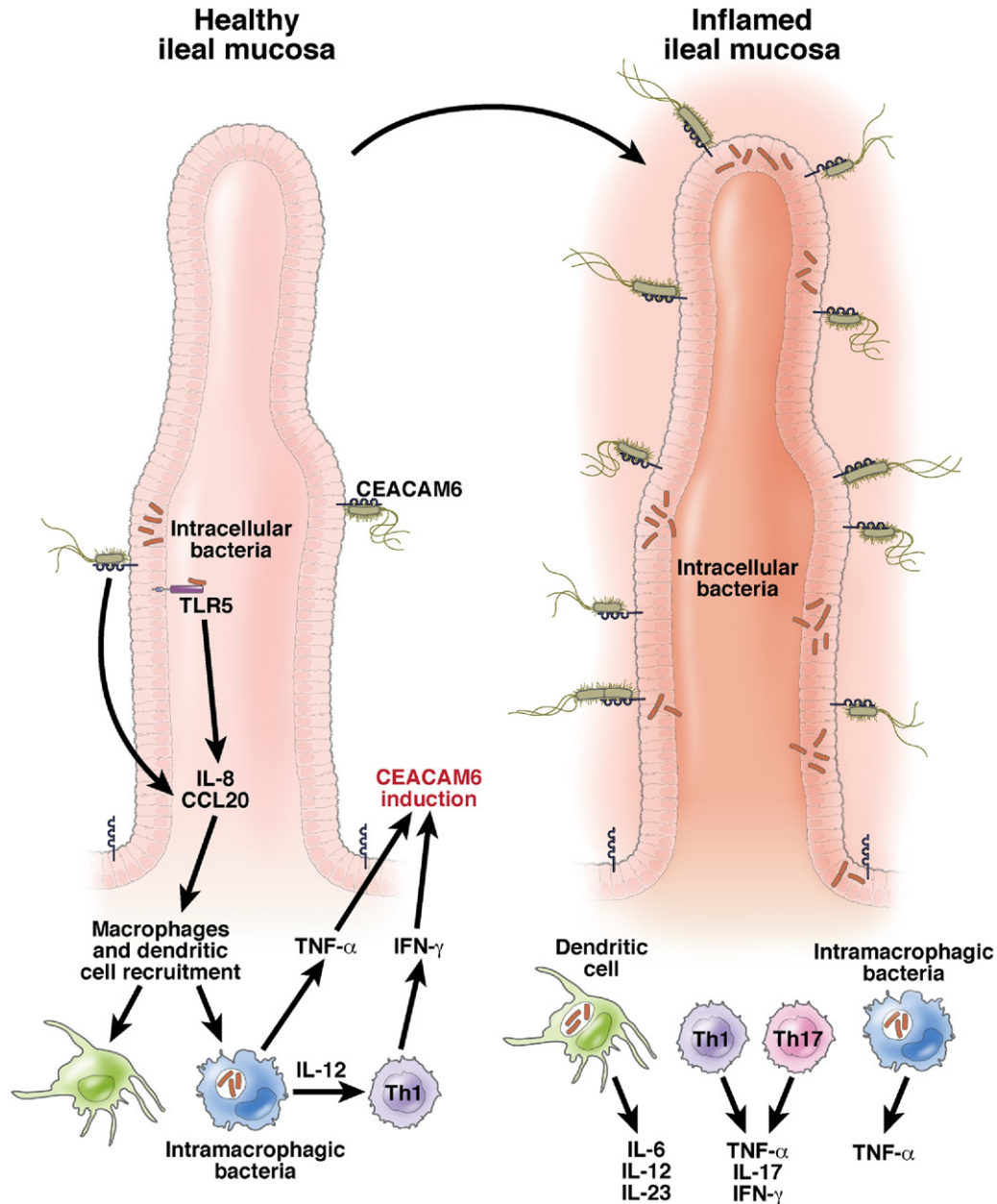
Analyses of histories of patients with *Yersinia enterocolitica* infection, based on antibody responses, showed that they have a statistically higher prevalence of CD compared with controls.<sup>80</sup> Searches for pathogenic *Yersinia* (*Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*) using PCR analyses led to the identification of *Yersinia* DNA in 31% of

resection specimens from patients with CD; a few also had *Yersinia* DNA in their mesenteric lymph nodes.<sup>81</sup> However, a similar study failed to detect any *Yersinia* DNA in CD specimens.<sup>82</sup> The role of *Yersinia* in pathogenesis of CD is unclear. NOD2 mutations mediate in vivo susceptibility to *Yersinia pseudotuberculosis* in mice,<sup>83</sup> indicating that the relationship between exposure to *Yersinia* and intestinal inflammation should be further investigated.

Food-borne bacterial infections might be the origin of some cases of IBD. Immunocytochemical analyses revealed the presence of *Listeria monocytogenes* in tissue samples from patients with CD,<sup>84</sup> but, as previously described for *Yersinia*, contradictory analysis using PCR or antigen analyses did not support the etiologic significance of *L. monocytogenes* in CD.<sup>82,85</sup> A Danish, population-based cohort, long-term follow-up study showed that gastroenteritis caused by nontyphoid *Salmonella* or thermophilic *Campylobacter* increased the risk of developing IBD.<sup>86</sup> Moreover, the prevalence of *Campylobacter* was higher among patients with CD than controls, so further investigations should be performed.<sup>87,88</sup>

Several independent studies have reported increased numbers of mucosa-associated *E. coli* with invasive properties or the presence of intramucosal *E. coli* in IBD patients.<sup>31,32,89-92</sup> These pathogenic *E. coli*, compared with commensal *E. coli*, have acquired specific virulence factors that increase their ability to adapt to new niches and allow them to cause disease. *E. coli* strains associated with the intestinal mucosa from CD patients are highly adherent to intestinal epithelial cells<sup>36</sup> and are also invasive.<sup>93</sup> On the basis of the pathogenic traits of CD-associated *E. coli*, a new, potentially pathogenic group of *E. coli* was designated AIEC, for adherent-invasive *Escherichia coli*.<sup>93</sup> They were isolated from ileal specimens of 36.4% of CD patients vs 6% of controls.<sup>90</sup> The higher prevalence of AIEC bacteria in CD patients might arise from an inability of the intestinal mucosa to control this infection, such as from defects in Paneth cell function and subsequent decreased secretion of antimicrobial peptides.<sup>53,54</sup> A loss of control of AIEC infection could also be related directly to autophagy deficiencies because of mutations in the genes *NOD2*, *ATG16L1*, or *IRGM*; functional autophagy restricts the replication of AIEC intracellular bacteria.<sup>94,95</sup> Another host factor that facilitates AIEC colonization could be abnormal ileal expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6), which has been observed in patients with ileal CD<sup>96</sup>; AIEC adhere to the brush border of primary ileal enterocytes isolated from CD patients but not from individuals without IBD,<sup>96</sup> related to abnormal expression of CEACAM6. Most AIEC strains associated with CD ileal mucosa express type 1 pili variants that increase the interaction between AIEC and ileal epithelial cells. Increased expression of CEACAM6 can result from interferon (IFN)- $\gamma$  or tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  stimulation and also from infection with AIEC bacteria, indicating that AIEC could





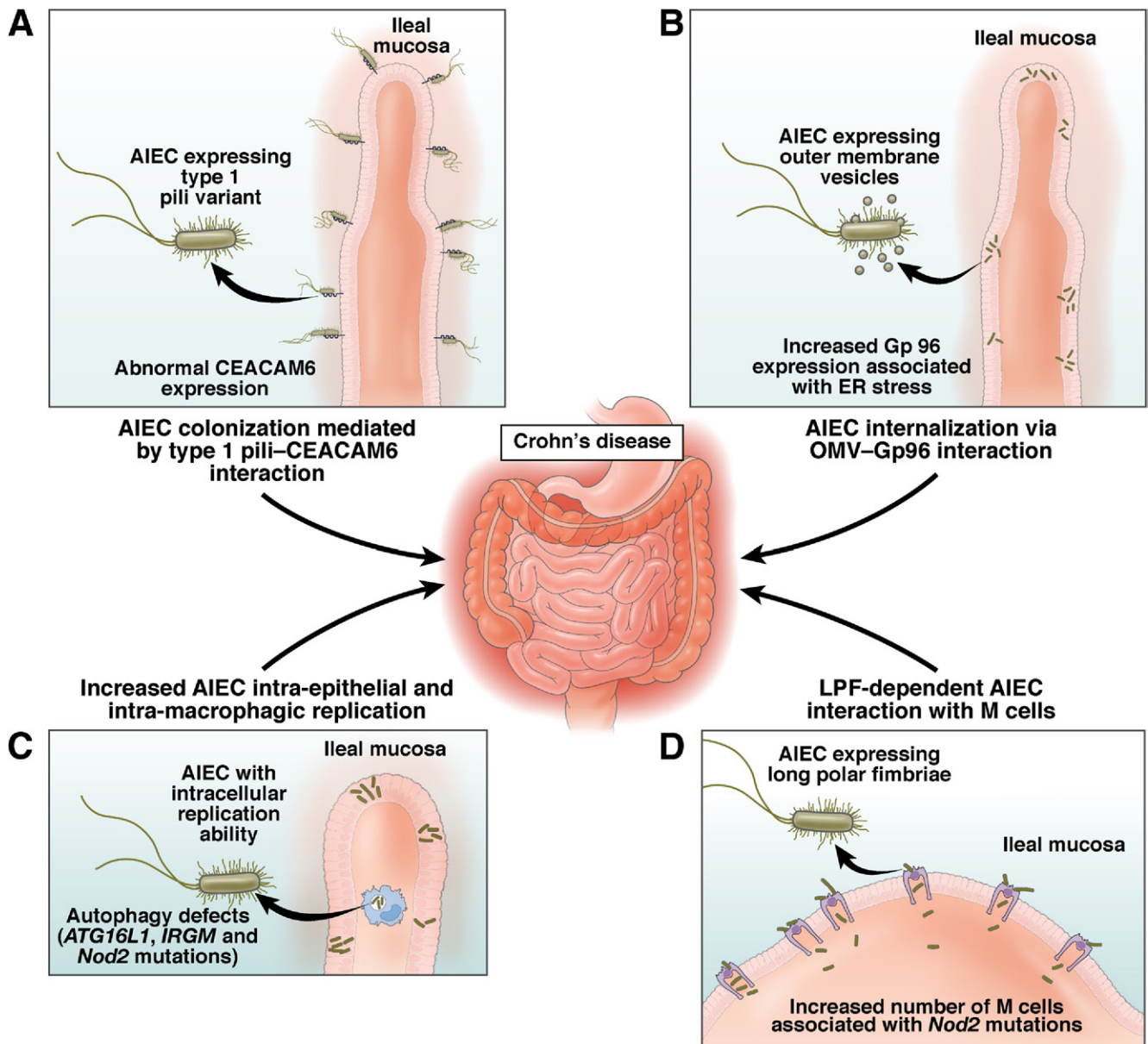
**Figure 2.** AIEC infection and loop of colonization and inflammation. In the early phase of CD development (*left panel*), extracellular AIEC (*in green*) adhere to the healthy ileal mucosa via type 1 pili recognizing CEACAM6 abnormally expressed by intestinal cells in CD patients. AIEC are able to invade intestinal epithelial cells and breach the intestinal barrier, allowing them to gain access to the lamina propria. By having access to the basolateral membrane, AIEC bacteria can induce IL-8 and CCL20 secretion by intestinal epithelial cells through the interaction between flagellin and Toll-like receptor 5, leading to the recruitment of neutrophils and dendritic cells. After phagocytosis by macrophages/dendritic cells, intracellular AIEC (*in orange*) replicate in a large vacuole, inducing production of TNF- $\alpha$  and IL-12, which activates Th1 cells to produce IFN- $\gamma$ . In inflamed ileal mucosa (*right panel*) expression of CEACAM6 is increased in response to TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  stimulation and AIEC infection of intestinal epithelial cells, creating loop of colonization and inflammation that leads to chronic disease with the secretion of proinflammatory cytokines IL-6, IL-12, IL-23, and IL-17.

promote their own colonization in CD patients (Figure 2). The presence of AIEC bacteria and their ability to induce the secretion of proinflammatory cytokines by infected macrophages could lead to an amplification loop of colonization and inflammation.<sup>96</sup> This was confirmed *in vivo*: AIEC LF82 pathogenic bacteria, but not nonpathogenic *E coli* K-12, persist in the gut of transgenic CEABAC10 mice that express human CEACAMs

and can induce severe colitis.<sup>97</sup> It was also observed that the endoplasmic reticulum (ER) stress response glycoprotein Gp96, which is overexpressed on the apical surface of ileal epithelial cells in patients with CD, acts as a host cell receptor for outer membrane vesicles, promoting invasion by AIEC.<sup>98</sup> Therefore, AIEC bacteria could take advantage of the ER stress occurring in patients with IBD (Figure 3). Because microbiota have an important role in







**Figure 3.** Four contributing ways of AIEC to CD. (A) AIEC colonize the GI tract using type 1 pili variants to adhere to the ileal mucosa. The type 1 pili variants bind to mannose residues of CEACAM6, which is expressed at high levels on the apical surface of ileal epithelial cells in patients with ileal CD. (B) The ER stress response protein Gp96 is overexpressed on the apical surface of ileal epithelial cells in patients with CD. Gp96 acts as a host-cell receptor for outer membrane vesicles released by AIEC, promoting AIEC invasion of the mucosa. (C) Intracellular AIEC bacteria replicate uncontrollably in host cells with autophagy defects caused by variants of ATG16L1, IRGM, or NOD2. (D) In patients with CD, variants in NOD2 increase the numbers of membranous/microfold cells. AIEC express long polar fimbriae, which allows the bacteria to interact with Peyer's patches and to translocate across monolayers of membranous/microfold cells.

the establishment of the ER stress response,<sup>99</sup> AIEC, as opportunistic pathogens, might take advantage of such changes in the host innate immune response. In addition, recurrent ileal CD originates with small erosions in the follicle-associated epithelium that lies over Peyer's patches; an analysis of the ability of AIEC strains to interact with Peyer's patches indicated that AIEC express long polar fimbriae that allow the bacteria to interact with mouse and human Peyer's patches and to translocate across membranous/microfold cells monolayers.<sup>100</sup> Inter-

estingly, it can be speculated that, in the presence of NOD2 variants as observed in CD, higher numbers of AIEC bacteria could interact with Peyer's patches because an increased number of membranous/microfold cells have been observed in NOD2 knock-out mice.<sup>101</sup>

The interaction between AIEC and intestinal epithelial cultured cells induces inflammatory responses such as up-regulated expression of IL-8 and CCL20, leading to transmigration of polymorphonuclear leukocytes and dendritic cells in coculture models.<sup>91</sup> AIEC can also disrupt the integ-



rity of the polarized epithelial cell monolayer, allowing bacteria to breach the intestinal barrier and to penetrate into the GI epithelium. These observations provide important links among microbes related to CD, the intestinal epithelial cell barrier, and IBD pathogenesis.<sup>91,102</sup> AIEC are also able to survive and to replicate extensively within a large, phagolysosome-like vacuole in macrophages.<sup>103,104</sup> Macrophages infected with AIEC release large amounts of TNF- $\alpha$ , and, in an in vitro model of human granuloma, AIEC-infected macrophages aggregate, fuse to form multinucleated giant cells, and subsequently recruit lymphocytes.<sup>103,105</sup> Interestingly, diseases with granulomatous response to *E. coli* have been reported in animals, and AIEC were isolated from Boxer dogs with granulomatous colitis.<sup>106</sup>

### Future Directions

Several lines of evidence indicate that dysbiosis or the presence of pathogenic agent mediate pathogenesis of IBD. It is not clear whether dysbiosis can cause IBD or is a consequence of the disease. Searches for a single pathogen that induces CD or UC have failed. However, CD-associated microbes could promote disease in genetically susceptible hosts with defects in innate immune system-mediated killing of microbes, mucosal barrier functions, or immunoregulation. Therefore, in addition to identifying host susceptibility factors, it will be necessary to identify and eliminate IBD-associated pathogens, block expression of their virulence factors, or alter their metabolism to treat IBD. Studies to identify changes in microbiota composition, gene expression, and metabolic profiles of IBD patients will provide important insights into the pathogenesis of IBD and new approaches for treatment.

The use of antibiotics as primary or adjuvant treatments for active luminal CD and UC is controversial. Data from many clinical trials are promising (reviewed in Sartor<sup>107</sup>), but only a few, large-scale, rigorously controlled clinical trials that analyzed the effect of antibiotic treatment have been performed. Patients with CD did not have a sustained response to combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for up to 2 years; short-term improvements were observed when these antibiotics were given with corticosteroids, most likely because of non-specific antibacterial effects.<sup>76</sup> In contrast, a recent meta-analysis reported that long-term treatment with nitroimidazoles or clofazimine was effective in preventing relapse or decreasing disease activity index in CD patients.<sup>108</sup> Different results observed among studies could arise from variations in the etiology of CD: specific subgroups might respond to different treatments. For example, a pilot study in patients with CD and actively draining perianal fistulas showed that remission and response occurred more frequently after treatment with ciprofloxacin than metronidazole or placebo.<sup>109</sup> Because the intestinal microbiota are likely to have a role in development of IBD, approaches to modulate GI flora might be effective, such as with antibiotics against specific proinflammatory bacteria or with selective probiot-

ics that can balance gut dysbiosis; these might be used as first-line therapies instead of immunosuppressive agents. The use of probiotics and prebiotics to increase concentrations of beneficial species looks promising, even though clinical trials have lacked the statistical power to demonstrate these effects because of small numbers of patients. Successful IBD therapies are likely to require individualized strategies, based on the specific features of each patient.

### Supplementary Material

Note: The first 50 references associated with this article are available below in print. The remaining references accompanying this article are available online only with the electronic version of the article. To access the remaining references, as well as additional online-only data, visit the online version of *Gastroenterology* at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org), and at [doi:10.1053/j.gastro.2011.01.054](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.054).

### References

- Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427–434.
- Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 2010;28:573–621.
- Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464:59–65.
- Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H, et al. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:5859–5864.
- Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006;312:1355–1359.
- Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol* 2010;10:735–744.
- D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, et al. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* 1998;114:262–267.
- Rutgeerts P, Geboes K, Peeters M, et al. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet* 1991;338:771–774.
- Mow WS, Vasilias EA, Lin YC, et al. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;126:414–424.
- Standaert-Vitse A, Jouault T, Vandewalle P, et al. *Candida albicans* is an immunogen for anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody markers of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006;130:1764–1775.
- Duchmann R, Neurath MF, Meyer zum Buschenfelde KH. Responses to self and non-self intestinal microflora in health and inflammatory bowel disease. *Res Immunol* 1997;148:589–594.
- Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, et al. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn's disease. *J Clin Invest* 2004;113:1296–1306.
- Ivanov II, Frutos Rde L, Manel N, et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 2008;4:337–349.
- Ivanov, II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009;139:485–498.
- Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lecuyer E, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 2009;31:677–689.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485–517.



17. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:44–54.
18. Neut C, Bulois P, Desreumaux P, et al. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97:939–946.
19. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006;55:205–211.
20. Mondot S, Kang S, Furet JP, et al. Highlighting new phylogenetic specificities of Crohn's disease microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:185–192.
21. Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13780–13785.
22. Nishikawa J, Kudo T, Sakata S, et al. Diversity of mucosa-associated microbiota in active and inactive ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2009;44:180–186.
23. Ott SJ, Plamondon S, Hart A, et al. Dynamics of the mucosa-associated flora in ulcerative colitis patients during remission and clinical relapse. *J Clin Microbiol* 2008;46:3510–3513.
24. Martinez C, Antolin M, Santos J, et al. Unstable composition of the fecal microbiota in ulcerative colitis during clinical remission. *Am J Gastroenterol* 2008;103:643–648.
25. Andoh A, Sakata S, Koizumi Y, et al. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the diversity of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:955–962.
26. Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, et al. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology* 2010;139:1844–1854.e1.
27. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003;52:237–242.
28. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16731–16736.
29. Martinez-Medina M, Aldeguer X, Gonzalez-Huix F, 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;12:1136–1145.
30. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, et al. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 2005;122:107–118.
31. Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, et al. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 2004;127:80–93.
32. Baumgart M, Dogan B, Rishniw 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;1:403–418.
33. Kotlowski R, Bernstein CN, Sepelri S, et al. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* 2007;56:669–675.
34. Conte MP, Schippa S, Zamboni I, et al. Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2006;55:1760–1767.
35. Mylonaki M, Rayment NB, Rampton DS, et al. Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:481–487.
36. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;115:1405–1413.
37. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Theissig F, et al. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut* 2007;56:343–350.
38. Png CW, Linden SK, Gilshenan KS, et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol* 2010;105:2420–2428.
39. Garrett WS, Lord GM, Punit S, et al. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell* 2007;131:33–45.
40. Lepage P, Colombet J, Marteau P, et al. Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut* 2008;57:424–425.
41. Stecher B, Robbiani R, Walker AW, et al. *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007;5:2177–2189.
42. Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, et al. Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe* 2007;2:204.
43. Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, et al. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* 1986;105:883–885.
44. Gassler N, Rohr C, Schneider A, et al. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G216–G228.
45. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, 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;56:61–72.
46. Keita AV, Salim SY, Jiang T, et al. Increased uptake of non-pathogenic *E coli* via the follicle-associated epithelium in long-standing ileal Crohn's disease. *J Pathol* 2008;215:135–144.
47. Morson BC. The early histological lesion of Crohn's disease. *Proc R Soc Med* 1972;65:71–72.
48. Braun A, Treede I, Gotthardt D, et al. Alterations of phospholipid concentration and species composition of the intestinal mucus barrier in ulcerative colitis: a clue to pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1705–1720.
49. Kaser A, Lee AH, Franke A, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 2008;134:743–756.
50. Heazlewood CK, Cook MC, Eri R, et al. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med* 2008;5:e54.

---

Received November 3, 2010. Accepted January 20, 2011.

#### Reprint requests

Address requests for reprints to: Arlette Darfeuille-Michaud, PhD, Pathogénie Bactérienne Intestinale, Laboratoire de Bactériologie, CBRV, 28 place Henri Dunant, 63001 Clermont-Ferrand, France. e-mail: [arlette.darfeuille-michaud@u-clermont1.fr](mailto:arlette.darfeuille-michaud@u-clermont1.fr); fax: (33) 473 178 371.

#### Acknowledgments

The authors thank Elisabeth Billard for her helpful critical reading of the manuscript.

#### Conflicts of interest

The authors disclose no conflicts.

#### Funding

Support was provided by Ministère de la Recherche et de la Technologie (JE2526; to A.D.-M.), by the Institut National de Recherche Agronomique (USC 2018; to A.D.-M.) and by grants from the Association F. Aupetit (AFA; to A.D.-M.), and European Commission through FP7 IBDase project (to A.D.-M.).



## References (Online Only)

51. Aldhous MC, Noble CL, Satsangi J. Dysregulation of human  $\beta$ -defensin-2 protein in inflammatory bowel disease. *PLoS One* 2009;4:e6285.
52. Nuding S, Fellermann K, Wehkamp J, et al. Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon. *Gut* 2007;56:1240–1247.
53. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, et al. Reduced Paneth cell  $\alpha$ -defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:18129–18134.
54. Salzman NH, Hung K, Haribhai D, et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol* 2010;11:76–83.
55. Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, et al. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol* 2003;4:269–273.
56. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, et al. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 2006;313:1126–1130.
57. Suzuki K, Meek B, Doi Y, et al. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:1981–1986.
58. Peterson DA, McNulty NP, Guruge JL, et al. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe* 2007;2:328–339.
59. Fagarasan S, Muramatsu M, Suzuki K, et al. Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science* 2002;298:1424–1427.
60. Yanagibashi T, Hosono A, Oyama A, et al. *Bacteroides* induce higher IgA production than *Lactobacillus* by increasing activation-induced cytidine deaminase expression in B cells in murine Peyer's patches. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009;73:372–377.
61. Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2008;8:458–466.
62. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007;39:207–211.
63. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007;39:596–604.
64. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007;447:661–678.
65. Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, et al. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* 2007;132:1665–1671.
66. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599–603.
67. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603–606.
68. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16L1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 2008;456:259–263.
69. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal  $\alpha$ -defensin expression. *Gut* 2004;53:1658–1664.
70. Stappenbeck TS, Rioux JD, Mizoguchi A, et al. Crohn disease: a current perspective on genetics, autophagy and immunity. *Autophagy* 2011;7:355–374.
71. Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* 2010;11:55–62.
72. Cooney R, Baker J, Brain O, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* 2010;16:90–7.
73. Sartor RB. Does *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease? *Gut* 2005;54:896–898.
74. Bernstein CN, Wang MH, Sargent M, et al. Testing the interaction between NOD-2 status and serological response to *Mycobacterium paratuberculosis* in cases of inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 2007;45:968–971.
75. Bentley RW, Keenan JI, Geary RB, et al. Incidence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in a population-based cohort of patients with Crohn's disease and control subjects. *Am J Gastroenterol* 2008;103:1168–1172.
76. Selby W, Pavli P, Crotty B, et al. Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology* 2007;132:2313–2319.
77. Olsen I, Tollefsen S, Aagaard C, et al. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis reactive CD4 T cells from intestinal biopsies of Crohn's disease patients. *PLoS One* 2009;4:e5641.
78. Singh UP, Singh S, Singh R, et al. Influence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis on colitis development and specific immune responses during disease. *Infect Immun* 2007;75:3722–3728.
79. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 2004;119:753–766.
80. Saebo A, Vik E, Lange OJ, et al. Inflammatory bowel disease associated with *Yersinia enterocolitica* O:3 infection. *Eur J Intern Med* 2005;16:176–182.
81. Lamps LW, Madhusudhan KT, Havens JM, et al. Pathogenic *Yersinia* DNA is detected in bowel and mesenteric lymph nodes from patients with Crohn's disease. *Am J Surg Pathol* 2003;27:220–227.
82. Knosel T, Schewe C, Petersen N, et al. Prevalence of infectious pathogens in Crohn's disease. *Pathol Res Pract* 2009;205:223–230.
83. Meinzer U, Esmiol-Welterlin S, Barreau F, et al. Nod2 mediates susceptibility to *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. *PLoS One* 2008;3:e2769.
84. Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, et al. Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1995;108:1396–1404.
85. Walmsley RS, Anthony A, Sim R, et al. Absence of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Klebsiella pneumoniae* antigens within inflammatory bowel disease tissues. *J Clin Pathol* 1998;51:657–661.
86. Gradel KO, Nielsen HL, Schonheyder HC, et al. Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after *Salmonella* or *Campylobacter* gastroenteritis. *Gastroenterology* 2009;137:495–501.
87. Man SM, Zhang L, Day AS, et al. *Campylobacter concisus* and other *Campylobacter* species in children with newly diagnosed Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1008–1016.
88. Zhang L, Man SM, Day AS, et al. Detection and isolation of *Campylobacter* species other than *C jejuni* from children with Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 2009;47:453–455.
89. Martinez-Medina M, Aldegue X, Lopez-Siles 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;15:872–882.
90. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal





- mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;127:412–421.
91. Eaves-Pyles T, Allen CA, Taormina J, 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;298:397–409.
  92. Sasaki M, Sitaraman SV, Babbin BA, et al. Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest* 2007;87:1042–1054.
  93. Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, et al. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* 1999;67:4499–4509.
  94. Lapaquette P, Glasser AL, Huett A, et al. Crohn's disease-associated adherent-invasive *E coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol* 2010;12:99–113.
  95. Brest P, Lapaquette P, Souidi M, 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;43:242–245.
  96. Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* 2007;117:1566–1574.
  97. Carvalho FA, Barnich N, Sivignon 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;206:2179–2189.
  98. Rolhion N, Barnich N, Bringer MA, et al. Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive *Escherichia coli* invasion. *Gut* 2010;59:1355–1362.
  99. Woo CW, Cui D, Arellano J, et al. Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by Toll-like receptor signalling. *Nat Cell Biol* 2009;11:1473–1480.
  100. Chassaing B, Rolhion N, De Vallée A, et al. Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *J Clin Invest* 2011;121:966–975.
  101. Barreau F, Meinzer U, Chareyre F, et al. CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *PLoS ONE* 2007;2:e523.
  102. Wine E, Ossa JC, Gray-Owen SD, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli*, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia. *BMC Microbiol* 2009;9:180.
  103. Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, 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;69:5529–5537.
  104. Bringer MA, Glasser AL, Tung CH, et al. The Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. *Cell Microbiol* 2006;8:471–484.
  105. Meconi S, Vercellone A, Levillain F, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients induce granulomas in vitro. *Cell Microbiol* 2007; 9:1252–1261.
  106. Simpson KW, Dogan B, Rishniw M, et al. Adherent and invasive *Escherichia coli* is associated with granulomatous colitis in boxer dogs. *Infect Immun* 2006;74:4778–4792.
  107. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004;126:1620–1633.
  108. Feller M, Huwiler K, Schoepfer A, et al. Long-term antibiotic treatment for Crohn's disease: systematic review and meta-analysis of placebo-controlled trials. *Clin Infect Dis* 2010;50:473–480.
  109. Thia KT, Mahadevan U, Feagan BG, et al. Ciprofloxacin or metronidazole for the treatment of perianal fistulas in patients with Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:17–24.
-



**Supplementary Table 1.** Experimental Models Highlighting the Role of Intestinal Microbiota in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases

Animal model	Phenotype	Involvement of intestinal microbiota in the development of inflammation	References
HLA-B27/human $\beta_2$ microglobulin transgenic rats	Spontaneous gastroduodenitis, colitis, arthritis, and spondylitis, with increased proinflammatory cytokines production	Transgenic germ-free rats had no colitis, and, when colonized with a defined bacterial cocktails, they redevelop colitis and gastritis	1, 2
Mice with null mutations in T-cell receptor	Spontaneous inflammatory bowel disease with cytokines imbalance and autoantibody production	Intestinal inflammation is initiated by a specific organism or group of organisms normally present in the gut flora	3–5
Interleukin 10-deficient mice	Uncontrolled immune responses stimulated by enteric antigens	Germ-free conditions prevent colitis	6–9
C3H/HeJBir mice	Spontaneous colitis with high titer serum IgG antibodies to a selected subset of antigens of the enteric bacterial flora	Therapeutic effects of antibiotics Adoptive transfer of bacterial-antigen-activated CD4 <sup>+</sup> T cells from colitic C3H/HeJBir mice into C3H/HeSnJ <i>scid/scid</i> recipients induced colitis	10, 11
Senescence accelerated mouse P1/Yit train	Spontaneous enteric inflammation associated with decreased intestinal barrier resistance due to altered ileal expression of claudin-2 and occludin	Reduced ileitis in germ-free SAMP1/YitFc mice compared with specific pathogen-free mice	12, 13
Interleukin 2-deficient mice	Spontaneous intestinal inflammation when raised under specific pathogen-free conditions	Germ-free mice only developed mild, focal, and nonlethal intestinal inflammation with delayed onset	14
T-bet-deficient mice	Spontaneous ulcerative colitis in the absence of adaptive immunity and increased susceptibility to colitis in immunologically intact hosts	Loss of T-bet influences bacterial populations to become colitogenic, and colitis is communicable to genetically intact hosts	15
Mouse double-KO with defects in both TGF- $\beta$ and IL-10 signaling	Uncontrolled production of proinflammatory cytokines	Disease process completely inhibited by a combination of broad-spectrum antibiotics	16

KO, knockout.

### Supplementary Table 1 References

- Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, et al. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human  $\beta_2$ m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 1990;63:1099–1112.
- Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, et al. Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human  $\beta_2$  microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* 1996;98:945–953.
- Mombaerts P, Clarke AR, Rudnicki MA, et al. Mutations in T-cell antigen receptor genes  $\alpha$  and  $\beta$  block thymocyte development at different stages. *Nature* 1992;360:225–231.
- Philpott KL, Viney JL, Kay G, et al. Lymphoid development in mice congenitally lacking T-cell receptor  $\alpha$   $\beta$ -expressing cells. *Science* 1992;256:1448–1452.
- Dianda L, Hanby AM, Wright NA, et al. T-cell receptor- $\alpha$   $\beta$ -deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment. *Am J Pathol* 1997;150:91–97.
- Kuhn R, Lohler J, Rennick D, et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263–274.
- Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, et al. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 1998;66:5224–5231.
- Hoentjen F, Harmsen HJ, Braat H, et al. Antibiotics with a selective aerobic or anaerobic spectrum have different therapeutic activities in various regions of the colon in interleukin 10 gene deficient mice. *Gut* 2003;52:1721–1727.
- Tamagawa H, Hiroi T, Mizushima T, et al. Therapeutic effects of roxithromycin in interleukin-10-deficient colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:547–556.
- Sundberg JP, Elson CO, Bedigian H, et al. Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology* 1994;107:1726–1735.
- Cong Y, Brandwein SL, McCabe RP, et al. CD4<sup>+</sup> T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *J Exp Med* 1998;187:855–864.
- Olson TS, Reuter BK, Scott KG, et al. The primary defect in experimental ileitis originates from a nonhematopoietic source. *J Exp Med* 2006;203:541–552.
- Matsumoto S, Okabe Y, Setoyama H, et al. Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. *Gut* 1998;43:71–78.
- Schultz M, Tonkonogy SL, Sellon RK, et al. IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *Am J Physiol* 1999;276:G1461–G1472.
- Garrett WS, Lord GM, Punit S, et al. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell* 2007;131:33–45.
- Kang SS, Bloom SM, Norian LA, et al. An antibiotic-responsive mouse model of fulminant ulcerative colitis. *PLoS Med* 2008;5:e41.



Annexe n°2

Interaction entre *Escherichia coli* et plaques de Peyer dans la maladie de Crohn : le rôle des long polar fimbriae

**Chassaing B.**, Darfeuille-Michaud A.

*Médecine / Sciences*, 2011;27:572-573.



## Interaction entre *Escherichia coli* et plaques de Peyer dans la maladie de Crohn : le rôle des long polar fimbriae

Benoit Chassaing, Arlette Darfeuille-Michaud

Pathogénie bactérienne intestinale,  
JE2526 Université d'Auvergne,  
USC-INRA 2018, CBRV,  
Facultés de médecine-pharmacie,  
28, place Henri Dunant, BP 38,  
63001 Clermont-Ferrand, France.  
[benoit.chassaing@u-clermont1.fr](mailto:benoit.chassaing@u-clermont1.fr)  
[arlette.darfeuille-michaud@u-clermont1.fr](mailto:arlette.darfeuille-michaud@u-clermont1.fr)

### Implication de bactéries invasives dans la maladie de Crohn

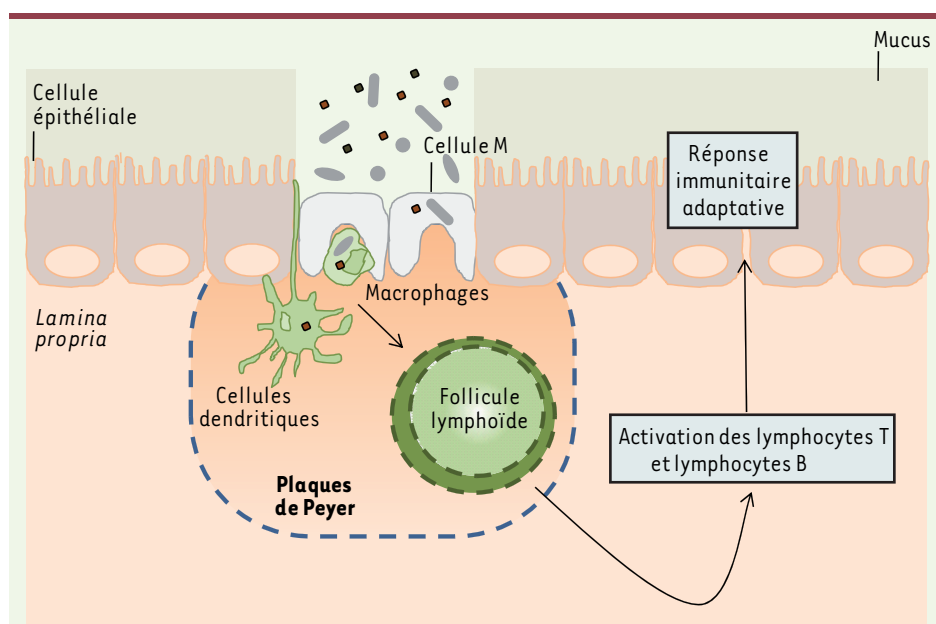
La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin qui affecte environ 1 000 dans les pays occidentaux, soit environ 2 millions de personnes dans le monde, et qui est caractérisée par un état d'hyperactivité du système immunitaire intestinal. Des études cliniques et épidémiologiques ont permis d'impliquer des facteurs environnementaux, génétiques et infectieux dans la survenue de cette maladie. En ce qui concerne les facteurs infectieux, il a été montré que la muqueuse iléale de patients atteints de la maladie de Crohn est anormalement colonisée par des souches de *Escherichia coli* appartenant à un groupe de bactéries pathogènes dénommées

*adherent-invasive E. coli* (AIEC), capables d'adhérer et d'envahir les cellules de la muqueuse intestinale et également de se multiplier dans les cellules épithéliales et les macrophages de l'hôte. La prévalence de souches AIEC au niveau iléal est de 36,4 % chez les patients atteints de MC contre seulement 6,2 % chez les sujets indemnes de pathologie inflammatoire intestinale [1]. La forte colonisation de la muqueuse iléale par des bactéries AIEC est en relation avec une expression anormale de molécules CEACAM6 (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6*) chez les patients [2, 3]. L'expression accrue de CEACAM6, récepteur impliqué dans l'adhésion des AIEC, serait consécutive à la stimulation des cellules épithéliales intestinales par des cytokines

pro-inflammatoires mais également à l'infection par ces bactéries qui sont ainsi capables de promouvoir leur propre colonisation.

### Cellules M des plaques de Peyer

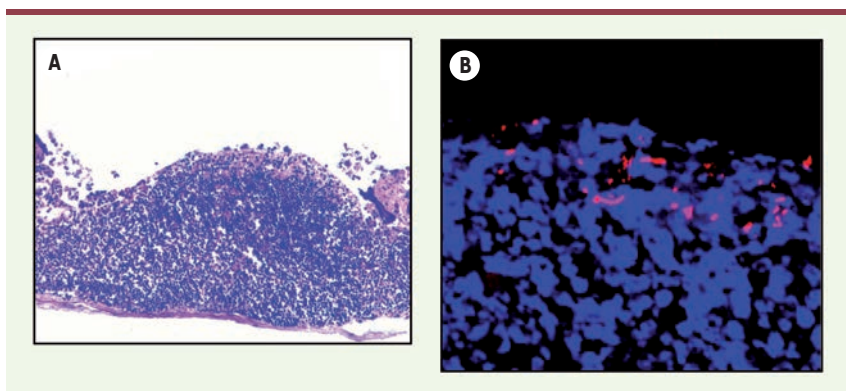
Les plaques de Peyer sont des acteurs majeurs du tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (MALT, *mucosa associated lymphoid tissue*). Il s'agit d'agrégats de follicules lymphoïdes principalement retrouvés dans l'iléon et le côlon. Les plaques de Peyer sont impliquées dans l'échantillonnage d'antigènes présents dans la lumière intestinale et dans leur présentation au système immunitaire sous-jacent [4]. Cette fonction est rendue possible par la présence, au niveau de l'épithélium recouvrant les plaques de Peyer, de cellules spécialisées appelées cellules M (Figure 1). Les cellules M ont un fort pouvoir de transcytose, ce qui permet aux antigènes présents dans la lumière intestinale de traverser la barrière épithéliale. La présentation antigénique aboutit



**Figure 1. Organisation schématique des plaques de Peyer associées à la paroi intestinale.** L'échantillonnage antigénique réalisé par les cellules M permet la présentation antigénique au système immunitaire sous-jacent (macrophages et cellules dendritiques) pour la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative mettant en jeu les lymphocytes T et B.







**Figure 2. Interaction des bactéries AIEC avec une plaque de Peyer.** **A.** Visualisation d'une plaque de Peyer murine après coloration à l'hématoxyline-éosine. **B.** Visualisation des bactéries AIEC (en rouge) par hybridation à l'aide d'une sonde fluorescente. Les noyaux des cellules sont colorés en bleu par le Hoechst.

à l'activation de lymphocytes T et B et à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative.

Plusieurs études cliniques ont montré que les plaques de Peyer jouent un rôle important dans l'initiation de la maladie de Crohn. En effet, les observations cliniques suggèrent que les sites initiaux de l'inflammation chez les patients apparaissent au niveau des follicules lymphoïdes, avec des lésions aphtoides<sup>1</sup> très précoces au niveau de l'épithélium recouvrant les plaques de Peyer [5, 6].

### Implication des long polar fimbriae dans le ciblage des plaques de Peyer par les bactéries AIEC

Sur la base des données bibliographiques, une étude européenne collaborative a été menée afin de déterminer si les bactéries AIEC associées à la maladie de Crohn pourraient être à l'origine des lésions précoces au niveau des plaques de Peyer chez les patients atteints de maladie de Crohn [7]. L'analyse de la séquence du génome de la souche AIEC de référence LF82 a permis de mettre en évidence la présence d'un groupe de gènes composant l'opéron *lpf*, codant les long polar fimbriae (LPF). Les LPF sont des appendices filamen-

teux exprimés à la surface des bactéries et susceptibles de permettre l'adhésion des bactéries à des cellules hôtes. De manière intéressante, l'inactivation de l'opéron *lpf* par mutagenèse dirigée conduit à une diminution drastique du pouvoir d'interaction de la souche AIEC LF82 avec des plaques de Peyer murines ou humaines. L'analyse à l'échelle cellulaire de l'interaction entre bactéries AIEC et plaques de Peyer a montré que les LPF permettent l'adhésion des bactéries aux cellules M présentes au niveau de l'épithélium recouvrant les plaques de Peyer (Figure 2).

Une interaction augmentée entre bactéries AIEC et plaques de Peyer pourrait exister chez les patients présentant des mutations du gène *NOD2* (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2). Ce gène, premier gène de susceptibilité mis en évidence chez les patients atteints de maladie de Crohn [8], code pour le récepteur intracytoplasmique NOD2 capable d'initier une réponse innée des cellules hôtes en réponse à une stimulation par le muramyl dipeptide bactérien. Une étude antérieure utilisant un modèle murin invalidé pour le récepteur Nod2 avait montré que les plaques de Peyer de ces animaux présentaient à leur surface un nombre de cellules M trois fois plus important que

celui des animaux sauvages [9]. Nous avons montré qu'une telle augmentation du nombre de cellules M permet à un plus grand nombre de bactéries AIEC exprimant les LPF d'interagir avec les plaques de Peyer d'animaux invalidés pour le gène *nod2*. ♦

**The interaction of Crohn's disease-associated *Escherichia coli* to Peyer's patches of the intestinal mucosa involves long polar fimbriae**

### REMERCIEMENTS

Nous remercions pour leur soutien l'Association François Aupetit dédiée à l'amélioration des connaissances sur les maladies inflammatoires chroniques intestinales (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique), l'Institut national de la recherche agronomique et le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

### CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

### RÉFÉRENCES

1. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 127 : 412-21.
2. Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* 2007; 117 : 1566-74.
3. Carvalho FA, Barnich N, Sivignon 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 : 2179-89.
4. Kiyono H, Fukuyama S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4 : 699-710.
5. Morson BC. The early histological lesion of Crohn's disease. *Proc R Soc Med* 1972; 65 : 71-2.
6. Gullberg E, Soderholm JD. Peyer's patches and M cells as potential sites of the inflammatory onset in Crohn's disease. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1072 : 218-32.
7. Chassaing B, Rolhion N, de Vallée A, 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 : 966-75.
8. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411 : 599-603.
9. Barreau F, Meinzer U, Chareyre F, et al. CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *PLoS one* 2007; 2 : p. e523.

<sup>1</sup> Un ulcère aphtoidé est constitué d'une petite érosion surplombant des follicules lymphoïdes hypertrophiés.



Annexe n°3

Interactions with M cells and Macrophages as Key Steps in the Pathogenesis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections

Etienne-Mesmin L., **Chassaing B.**, Sauvanet P., Denizot J., Blanquet-Diot S., Darfeuille-Michaud A., Pradel N., Livrelli V.

*Plos One*, 2011;6,e23594.



# Interactions with M Cells and Macrophages as Key Steps in the Pathogenesis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections

Lucie Etienne-Mesmin<sup>1,2,3,4</sup>, Benoit Chassaing<sup>1,2</sup>, Pierre Sauvanet<sup>1,2,5</sup>, Jérémy Denizot<sup>1,2</sup>, Stéphanie Blanquet-Diot<sup>3,4</sup>, Arlette Darfeuille-Michaud<sup>1,2</sup>, Nathalie Pradel<sup>1,2\*</sup>, Valérie Livrelli<sup>1,2,4,6\*</sup>

**1** Clermont Université, Université d'Auvergne, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, JE 2526 Evolution des bactéries pathogènes et susceptibilité génétique de l'hôte, Clermont-Ferrand, France, **2** INRA, Institut National Recherche Agronomique, Unité Sous Contrat USC-2018, Clermont-Ferrand, France, **3** Clermont Université, Université d'Auvergne, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, ERT 18, Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament, Clermont-Ferrand, France, **4** Clermont Université, Université d'Auvergne, UFR Pharmacie, Clermont-Ferrand, France, **5** CHU Clermont Ferrand, Pôle des Pathologies Digestives, Clermont-Ferrand, France, **6** CHU Clermont-Ferrand, Service Bactériologie Mycologie Parasitologie, Clermont-Ferrand, France

## Abstract

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are food-borne pathogens that can cause serious infections ranging from diarrhea to hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic-uremic syndrome (HUS). Translocation of Shiga-toxins (Stx) from the gut lumen to underlying tissues is a decisive step in the development of the infection, but the mechanisms involved remain unclear. Many bacterial pathogens target the follicle-associated epithelium, which overlies Peyer's patches (PPs), cross the intestinal barrier through M cells and are captured by mucosal macrophages. Here, translocation across M cells, as well as survival and proliferation of EHEC strains within THP-1 macrophages were investigated using EHEC O157:H7 reference strains, isogenic mutants, and 15 EHEC strains isolated from HC/HUS patients. We showed for the first time that *E. coli* O157:H7 strains are able to interact *in vivo* with murine PPs, to translocate *ex vivo* through murine ileal mucosa with PPs and across an *in vitro* human M cell model. EHEC strains are also able to survive and to produce Stx in macrophages, which induce cell apoptosis and Stx release. In conclusion, our results suggest that the uptake of EHEC by M cells and underlying macrophages in the PP may be a critical step in Stx translocation and release *in vivo*. A new model for EHEC infection in humans is proposed that could help in a fuller understanding of EHEC-associated diseases.

**Citation:** Etienne-Mesmin L, Chassaing B, Sauvanet P, Denizot J, Blanquet-Diot S, et al. (2011) Interactions with M Cells and Macrophages as Key Steps in the Pathogenesis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections. PLoS ONE 6(8): e23594. doi:10.1371/journal.pone.0023594

**Editor:** Dipshikha Chakravorty, Indian Institute of Science, India

**Received:** March 21, 2011; **Accepted:** July 21, 2011; **Published:** August 17, 2011

**Copyright:** © 2011 Etienne-Mesmin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was supported by grants from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (JE2526) (<http://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/>) and by the Institut National de Recherche Agronomique (USC-2018) (<http://www.inra.fr/>). There are no grant numbers. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: [valerie.livrelli@u-clermont1.fr](mailto:valerie.livrelli@u-clermont1.fr)

† Current address: Laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie des Environnements Chauds, UMR\_D 180, Université de Provence et de la Méditerranée, Marseille, France

## Introduction

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), a subset of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), have been associated with human diseases, ranging from uncomplicated diarrhea to hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic-uremic syndrome (HUS). A recent major outbreak in Germany, with thousands cases of foodborne illness (and approximately 25% of them progressing to HUS) has shed light on EHEC [1,2]. The gastrointestinal tract of cattle and other ruminants appears to be the main reservoir of STEC strains [3,4]. Several studies have reported a high prevalence of STEC belonging to a wide range of serotypes in animals and food products [3,4,5]. However, only a limited number of serotypes have been associated with human disease, among which O157:H7 is predominant [3,6]. The association of serotypes with disease of varying severity in humans and with outbreaks or sporadic disease has led to the proposal that STEC be classified into 5 seropathotypes, from A (most virulent) to E (serotypes that have not been involved in disease in humans) [7].

EHEC colonize the digestive tract of humans and produce Shiga toxins (Stx1 and/or Stx2), also known as Verotoxins, which are essential for virulence. Epidemiological studies, together with *in vitro* and *in vivo* experiments, have shown that Stx2 is the most common virulence factor associated with severe human disease [3]. Stx are composed of an enzymatically active A subunit and a pentameric B subunit. The B subunits form a doughnut-shaped structure with a central pore and bind to the glycosphingolipid globotriaosylceramide (Gb3, also known as CD77), which is expressed at the surface of endothelial cells, leading to subsequent internalization of the toxin [8]. The A subunit is able to inhibit elongation of the peptide chain during protein synthesis, resulting in eukaryotic cell death, tissue damage and organ failure [3,8]. EHEC, together with enteropathogenic *E. coli* (EPEC), belong to the attaching and effacing (A/E) bacterial pathogens. They induce histopathological lesions characterized by localized effacement of the brush border microvilli and intimate attachment of the bacteria to the apical membrane of epithelial cells, through the formation of cytoskeletal actin pedestals [9,10]. All the genes



involved in A/E lesions map to a pathogenicity island, the Locus for Enterocyte Effacement (LEE) that encodes a type III secretion system (TTSS) involved in the injection of several proteins and effectors [11]. The first gene associated with A/E lesions is the *eae* gene encoding intimin, an outer membrane protein. Intimin binding to Tir, a receptor translocated from the bacteria to the host cell, mediates intimate adherence of the bacterium to epithelial cells. Several intimin types have been identified that may determine the host tropism [12]. Many other factors have been suggested to be associated with EHEC virulence. These include enterohemolysin, a pore-forming cytolysin, an extracellular serine-protease, and a catalase-peroxidase [3,13]. Flagella are also thought to play a role in adherence to epithelial cells. H7 flagella have been shown to act as an adhesin to bovine intestinal epithelium [14] and H7 flagellin (encoded by the *fliC* gene) induced proinflammatory signals in human colon epithelial cells through activation of the MAP kinase and NF- $\kappa$ B pathways [15].

Experiments using *in vitro* organ culture (IVOC) of human intestinal mucosa revealed a preferential tropism of EHEC O157:H7 for the follicle-associated epithelium (FAE) overlying the distal ileal Peyer's patches (PPs), where it causes A/E lesions [12,16,17]. The FAE is characterized by the presence of specialized "membranous" or "microfold" cells (M cells), which are specialized in the translocation of microorganisms and antigens from the intestinal lumen to the basolateral side of the epithelium, where they are delivered to the underlying macrophages [18,19]. While M cells are primarily involved in sampling intestinal antigens, many invasive *Enterobacteriaceae*, such as *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [20], rabbit enteroadherent *E. coli* [21] or Adherent-Invasive *E. coli* (AIEC) isolated from patients with Crohn's disease [22,23], take advantage of the transcytotic characteristics of M cells to use them as an entry site to translocate across the intestinal barrier.

Systemic complications associated with EHEC diseases such as HUS require the expression and translocation of Stx, which are produced by colonizing bacteria, from the gut lumen to underlying tissues and the bloodstream. However, the mechanism of Stx translocation across the epithelial barrier remains unclear as human intestinal cells lack Gb3, the Stx receptor. Since EHEC O157:H7 was found to interact initially with FAE in both humans and cattle [12,16,24], we hypothesized that the uptake of bacteria by M cells and underlying macrophages may be the first stage in Stx translocation, and may represent an important step in the pathogenesis of EHEC infections. We report here the interactions of EHEC strains *in vivo* and *ex vivo* with murine PPs, and *in vitro* using a human M cell model. Binding to the FAE and translocation through M cells may result in the rapid contact of bacteria with underlying human macrophages. However, little information is known about the interactions between EHEC strains and these cells. We decided, therefore, to investigate entry, survival and proliferation of EHEC strains belonging to serotypes A to C in human THP-1 macrophages. EHEC were found to survive and to produce Stx within macrophages, leading to host cell apoptosis and Stx release.

## Materials and Methods

### Bacterial strains

Bacterial strains and plasmids used in this study are given in **Table 1**. The green fluorescent protein (GFP)-expressing strains were obtained by electroporation of a high-copy plasmid pFPV25.1. Before use, each strain was streaked onto LB agar plates (BD Bioscience, USA) and grown overnight at 37°C in LB broth, unless otherwise stated. When necessary, kanamycin or

ampicillin was added to the medium at 50  $\mu$ g/ml. For *ex vivo* experiments, a non pathogenic *E. coli* strain MG1655 (Rif<sup>R</sup>) was used and plated on LB medium containing rifampicin (300  $\mu$ g/ml).

### Ethics statement

Animal protocols were approved by the committee for ethical issues, CEMEA Auvergne (Agreement to Nicolas Barnich, CEMEA CE16-09, Clermont-Ferrand, France). Mice were killed by cervical dislocation according to animal care procedure.

### *Ex vivo* interactions with murine Peyer's patches

Eight- to ten-week old FVB/N wild-type male mice were bred and reared in the animal care facility at the Université d'Auvergne (Clermont-Ferrand, France) under specific pathogen free (SPF) conditions.

Biopsies from ileum with or without PP were immediately removed from mouse intestine and used for Ussing chamber experiments. Briefly, 1 cm of ileal samples was opened along the mesenteric border, splatted and mounted in an Ussing chamber with an opening area of 0.96 mm<sup>2</sup>. Tissues were bathed in 37°C-oxygenated Ringer solution for 5 h. A total of 1.6 ml of  $1 \times 10^7$  CFU/ml (colony forming units) of EHEC or non pathogenic *E. coli* was added to the mucosal compartment and 1.6 ml of Ringer buffer was placed into the serosal side. To quantify the bacteria translocated across mucosa, medium from the serosal compartment was collected every hour, diluted, and plated onto LB agar plates. The integrity of ileal mucosa was monitored throughout Ussing chamber experiments using Fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma, St. Louis, MO). FITC diffusion was assessed by fluorescence measurement in a microplate fluorescent reader (Fluoroskan Ascent FL, Thermo) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 522 nm.

### Mice ileal loop assay

Interactions of EHEC bacteria with PPs were studied using mouse ileal loops, as previously described by Hitotsubashi *et al.* [25]. FVB/N wild-type male mice were starved for 24 h before operation but provided with water *ad libitum*. The animals were anesthetized and their intestine exteriorized through a midline incision. Two or three intestinal segments (about 1 cm), each containing one PP, were ligated, and  $5 \times 10^8$  CFU of bacteria (EHEC 86-24 WT and 86-24  $\Delta$ stx<sub>2</sub>, a non-pathogenic *E. coli* strain K-12 C600, and a control AIEC strain LF82) were injected into the ileal loop. Two hours after injection, the animals were killed and the loops were excised. To find a colocalization of 86-24 WT bacteria with M cells, 4  $\mu$ m sections of paraffin-embedded PPs were stained with Tetramethyl Rhodamine Isocyanate (TRITC)-labeled *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA I, Sigma-Aldrich, France) to label M cells. Hoechst was used for nuclear staining and a monoclonal mouse antibody raised against *E. coli* LPS O157 (Abcam, France) was used to label EHEC bacteria. The slides were then analyzed with a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope.

### Cell lines and cell culture

The *in vitro* M cell co-culture model was first developed by Kerneis *et al.* and later adapted by Gullberg *et al.* [26,27]. The human colorectal adenocarcinoma cell-line Caco-2 clone 1 [27] was grown in complete DMEM (PAA, Austria), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Lonza, Switzerland), 4 mM L-glutamine (PAA), 100 U/ml penicillin (PAA) and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (PAA). The human Burkitt's lymphoma cell-line Raji B (ECACC 85011429) was grown in





**Table 1.** Bacterial strains and plasmid used in this study.

Strains or plasmids	Serotype	Seropathotype	Characteristics	stx genotype	Source or reference
<b>Strains</b>					
86-24 WT	O157:H7	A	Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> O157:H7 reference strain	stx1– stx2+	[44]
86-24 $\Delta$ stx2	O157:H7	NA	86-24 isogenic mutant with stx2 gene deleted	stx1– stx2–	[15]
86-24 $\Delta$ eae	O157:H7	NA	86-24 isogenic mutant with eae gene deleted	stx1– stx2+	[15]
86-24 $\Delta$ fliC	O157:H7	NA	86-24 isogenic mutant with fliC gene deleted	stx1– stx2+	[15]
EDL933	O157:H7	A	Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> O157:H7 reference strain	stx1+ stx2+	ATCC 43895
CHVi-1	O157:H7	A	<i>E. coli</i> isolated from a clinical case with HUS	stx1– stx2+	[13]
CH1898	O157:H7	A	<i>E. coli</i> isolated from a clinical case with HUS	stx1– stx2+	[13]
CH075	O157:H7	A	<i>E. coli</i> isolated from a clinical case with HUS	stx1– stx2+	[13]
CH087	O103:H2	B	<i>E. coli</i> isolated from a clinical case with HUS	stx1+ stx2–	[13]
CH089	O103:H2	B	<i>E. coli</i> isolated from a clinical case with HC	stx1+ stx2–	[13]
NV-10	O26:H11	B	<i>E. coli</i> isolated from a clinical case with diarrhea	stx1+ stx2–	[4]
CH071	O157:H26	C	<i>E. coli</i> isolated from a clinical case with HUS	stx1– stx2+	[13]
CH013	O91:H10	C	<i>E. coli</i> isolated from a clinical case with HUS	stx1– stx2+	[13]
CH085	O91:H10	C	<i>E. coli</i> isolated from a clinical case with HUS	stx1– stx2+	[13]
CH014	O91:H21	C	<i>E. coli</i> isolated from a clinical case with HUS	stx1– stx2+	[13]
VTH13	O91:H21	C	<i>E. coli</i> isolated from a clinical case with HC	stx1+ stx2+	Blanco J <sup>a</sup>
CH016	O174:H–	C	<i>E. coli</i> isolated from a clinical case with HUS	stx1– stx2+	[13]
CH123	O5:H–	ND	<i>E. coli</i> isolated from a clinical case with HC	stx1+ stx2–	[13]
CH017	O+H–	ND	<i>E. coli</i> isolated from a clinical case with HUS	stx1– stx2+	[13]
CH023	O+H–	ND	<i>E. coli</i> isolated from a clinical case with HUS	stx1– stx2+	[13]
LF82	O83:H1	NA	Adherent-Invasive <i>E. coli</i> isolated from a patient with Crohn's disease	NA	[45]
MG1655	OR:H48/K–	NA	Non pathogenic <i>E. coli</i>	NA	Laboratory stock
C600	K-12	NA	Non pathogenic <i>E. coli</i>	NA	Laboratory stock
<b>Plasmid</b>					
pFPV25.1			Plasmid constitutively expressing GFP		[46]

NA, not applicable; ND, not determined; HUS, Hemolytic-uremic syndrome; HC, Hemorrhagic colitis; WT, wild-type.

<sup>a</sup>Laboratorio de Referencia de *E. coli*, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Spain.

doi:10.1371/journal.pone.0023594.t001

complete RPMI-1640 medium (PAA), supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 8 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin.

The human (macrophage-like) monocyte cell line THP-1 (ATCC TIB202) was maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 4 mM L-

glutamine. THP-1 cells were activated using 20 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich), seeded in 24-well tissue culture plates (BD Falcon, USA) at a density of  $5 \times 10^5$  cells per  $\text{cm}^2$ , and grown for 18 h.

Vero cells (African green monkey kidney cells, ATCC CRL 1587) were grown at 37°C in Eagle basal medium (Seromed,



Germany) supplemented with 10% FBS, 8 mM l-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 1% vitamin solution, and seeded in 96-well tissue culture plates at a density of  $10^6$  cells per ml.

All the cell lines were grown at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere.

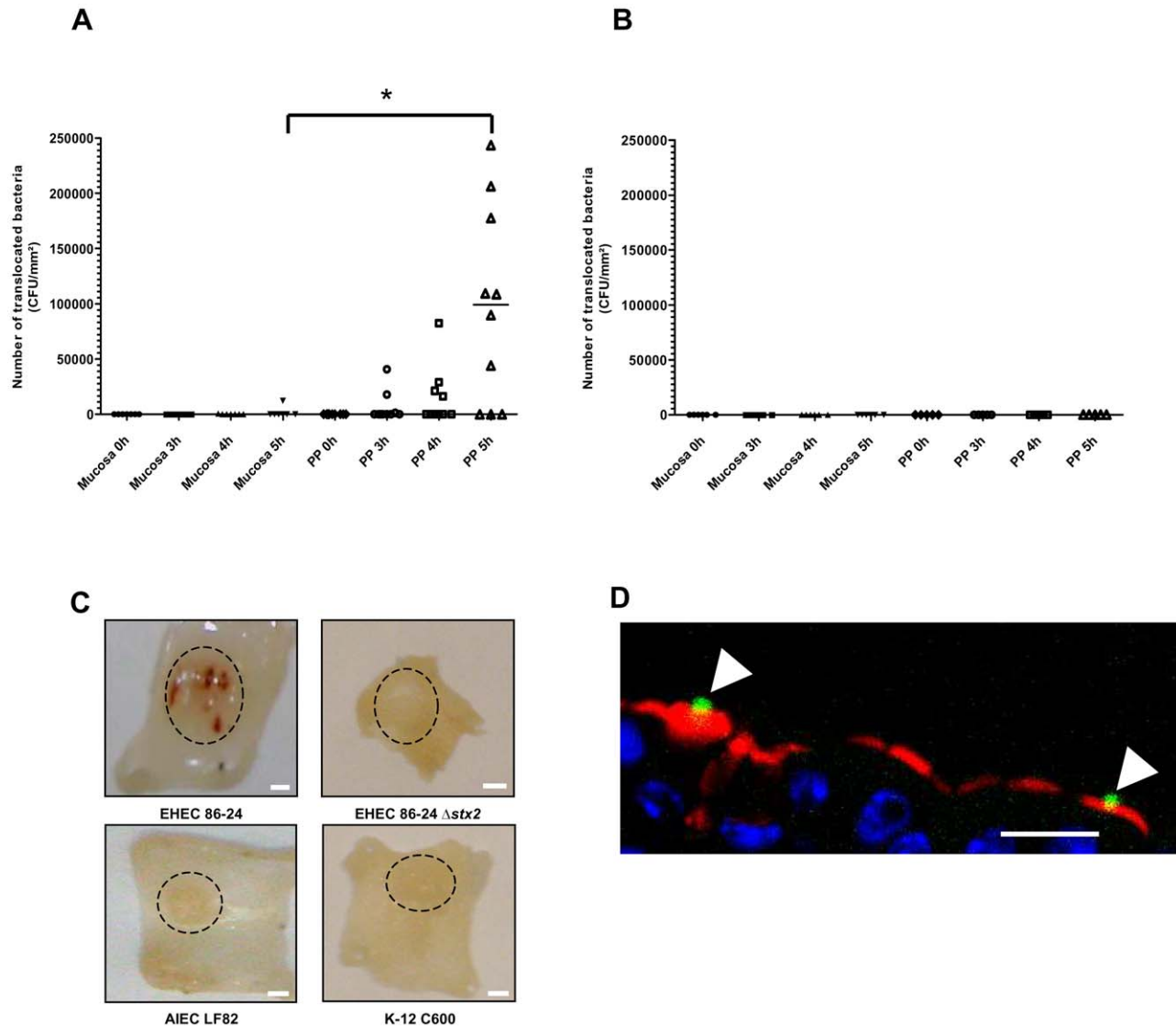
### Vero toxin assay

To quantify Stx production, bacterial culture supernatants and infected THP-1 supernatants were tested for cytotoxicity in the Vero cell assay, as previously described [4]. THP-1 cells were infected for 2 h, extra-cellular bacteria were removed and fresh

medium was added for 3 h, before testing Stx in supernatants. The Stx titre was expressed as the reciprocal of the highest filtrate dilution that caused 50% cell detachment after 24 h of incubation, as judged by the dye intensity and by microscopic observation (the breakpoint for a positive result was a titer of 4). Known concentrations of purified Stx2 (Toxin Technology, USA) were used to estimate the range of Stx2 release within macrophages. Each experiment was performed at least 3 times.

### Bacterial translocation across M cells

A total of  $1 \times 10^6$  Caco-2-cl1 cells per ml were seeded onto the apical aspect of Transwell™ filters (Millipore Ltd, UK) previously

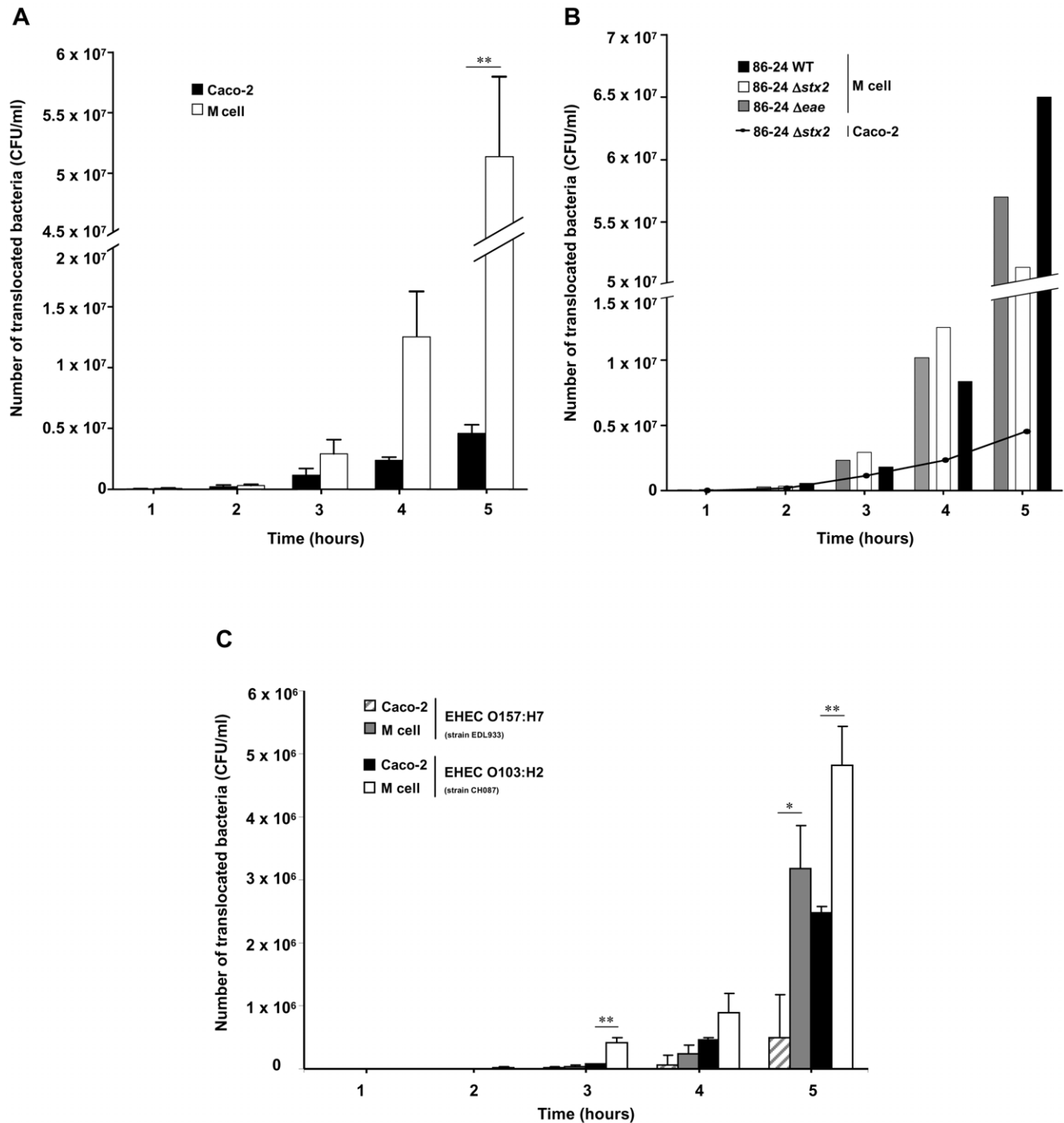


**Figure 1. Ex vivo transmucosal uptake of EHEC bacteria by murine Peyer's patches, and in vivo interactions with murine M cells in ileal loop assays.** (A) Ex vivo interaction of *E. coli* O157:H7 (strain 86-24 WT) with murine mucosa isolated from the ileum with ( $n = 10$ ) or without ( $n = 7$ ) Peyer's patches (PPs) in Ussing chambers. Each point represents the number of translocated bacteria (CFU/mm<sup>2</sup>) for one experiment at the time of infection (0 h) and after 3 h, 4 h and 5 h of contact. Lines represent the median values of the group. Comparisons were made with the Mann-Whitney test. \*, ileum with PP significantly different from ileal mucosa ( $P < 0.05$ ). (B) Ex vivo interaction of non pathogenic *E. coli* MG1655 with murine ileal mucosa isolated from the ileum with ( $n = 5$ ) or without ( $n = 6$ ) PPs in Ussing chambers. Each point represents the number of translocated bacteria (CFU/mm<sup>2</sup>) for one experiment at the time of infection (0 h) and after 3 h, 4 h and 5 h of contact. (C) Macroscopic analysis of murine PP sections after a two-hour contact with EHEC 86-24 WT, 86-24  $\Delta$ stx2, AIEC strain LF82 and non pathogenic *E. coli* K-12 strain C600 in ileal loop assays. Dashed circles indicate PP. Scale bar = 1 mm. (D) Confocal analysis of murine PP sections after labeling of EHEC 86-24 WT with anti LPS O157 antibody (green), of M cell with UEA-1 TRITC (red) and DNA with Hoechst (blue). Scale bar = 20 µm. Arrowheads, bacteria associated with UEA-1-positive cells. doi:10.1371/journal.pone.0023594.g001



coated with BD Matrigel™ (USA). Cells were carefully cultured for 17 days until they reached a fully differentiated phenotype.  $5 \times 10^5$  Raji-B cells were added to the basolateral compartment of Caco-2 monolayers and co-culture was maintained for 4–6 days. Monocultures of Caco-2 cells on matched filter supports were used as control.

For translocation assay, apical surface of M-cells were infected with  $1 \times 10^7$  bacteria per transwell. Samples from basolateral media were collected every hour for 5 h, and 10-fold dilutions were plated onto LB agar. The integrity of cell monolayers was tested by monitoring trans-epithelial electrical resistance (TEER) with a Millicell®-ERS (Millipore).



**Figure 2. In vitro translocation of EHEC strains across human M cell monolayers.** The number of translocated bacteria (CFU/ml) at 1 to 5 h post infection was determined in M cell monolayers versus control Caco-2 monolayers, for EHEC 86-24  $\Delta$ stx2 (O157:H7) (A) and compared with 86-24 WT and 86-24  $\Delta$ eae (B) and with EDL 933 (O157:H7) and CH087 (O103:H2) (C). Results are means  $\pm$  standard error of mean (SEM) for replicate experiments. Translocation through M cell monolayers significantly different from that of Caco-2 monolayers (\*  $P < 0.05$  or \*\*  $P < 0.01$ ). doi:10.1371/journal.pone.0023594.g002



### Bacterial uptake, survival and replication in human macrophages

Bacterial uptake, survival and replication were measured by the gentamicin protection assay. Bacterial strains were grown for 2 h at 37°C in LB. Before infection, cell monolayers were washed twice with PBS and the medium was replaced with 1 ml of RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated FBS for 2 h. THP-1 cells were infected with a multiplicity of infection (MOI) of 10 bacteria per macrophage. After a 2-h incubation, infected macrophages were washed twice with PBS, and fresh cell culture medium containing 20 µg/ml of gentamicin was added to kill extracellular bacteria. After incubation for 1, 4, 24 or 48 h, the medium was removed, cells were washed once with PBS, and a 5 min treatment with 500 µl 1X-triton was used to lyse the eukaryotic cells. This concentration of Triton X-100 had no effect on bacterial viability for at least 30 min. Samples were collected, diluted, and plated onto Mueller-Hinton agar plates to determine the number of bacteria surviving gentamicin killing assay. Survival was expressed either as CFU/well or as the mean percentage of the number of bacteria recovered at 4, 24 and 48 h post-infection, compared to that at 1 h post-infection, defined as 100%. Each experiment was performed at least five times.

### Lactate dehydrogenase activity (LDH)

Supernatants of infected macrophages were sampled at 1, 4, 8 and 24 h of gentamicin treatment, and assayed for LDH activity using reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) as a substrate (LDH kit, Boehringer Mannheim, France).

### Hoechst Staining of THP-1 macrophages

Coverslips with adherent infected THP-1 cells were collected at specified time points, fixed with 4% paraformaldehyde, washed twice with PBS, and stained with Hoechst (5 mg/ml) for 30 min at room temperature. Coverslips were washed three times with saponin, twice with PBS, and mounted on glass slides. Apoptotic nuclei were quantified by fluorescence microscopy. Each experiment was performed four times. Five random fields were counted on each slide.

### Transmission electron microscopy (TEM)

Cross sections of THP-1 cells were prepared as follows. After infection, cells were fixed with 3% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer at 4°C for 2 h and post fixed in 1% OsO<sub>4</sub> in cacodylate buffer at 4°C for 1 h. After dehydration in ethanol, cultures were embedded in a 2-mm-thick Epon coating and polymerized for 3 days at 60°C. Suitable areas were oriented parallel to the cell layer surface on Epon blocks with an Epon mixture. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Grids were examined with Hitachi H7650 TEM.

### Confocal microscopy of infected THP-1 macrophages

After infection with GFP-expressing bacteria, as described above, THP-1 cells were washed with PBS to eliminate extracellular bacteria and fixed with 3% paraformaldehyde for 10 min. Fixed-cells were washed with PBS, incubated for 5 min with 0.1 M glycine, washed with PBS, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 20 min. After PBS-washing, slides were incubated twice for 10 min, each time with PBS-0.2% gelatin. Actin cytoskeleton was stained for 15 min using TRITC-phalloidin (Sigma-Aldrich, France). Monolayers were then washed with PBS and distilled water, stained with 49,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and mounted on glass slides with a Mowiol solution (Calbiochem, Darmstadt, Germany). The slides were examined with a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope.

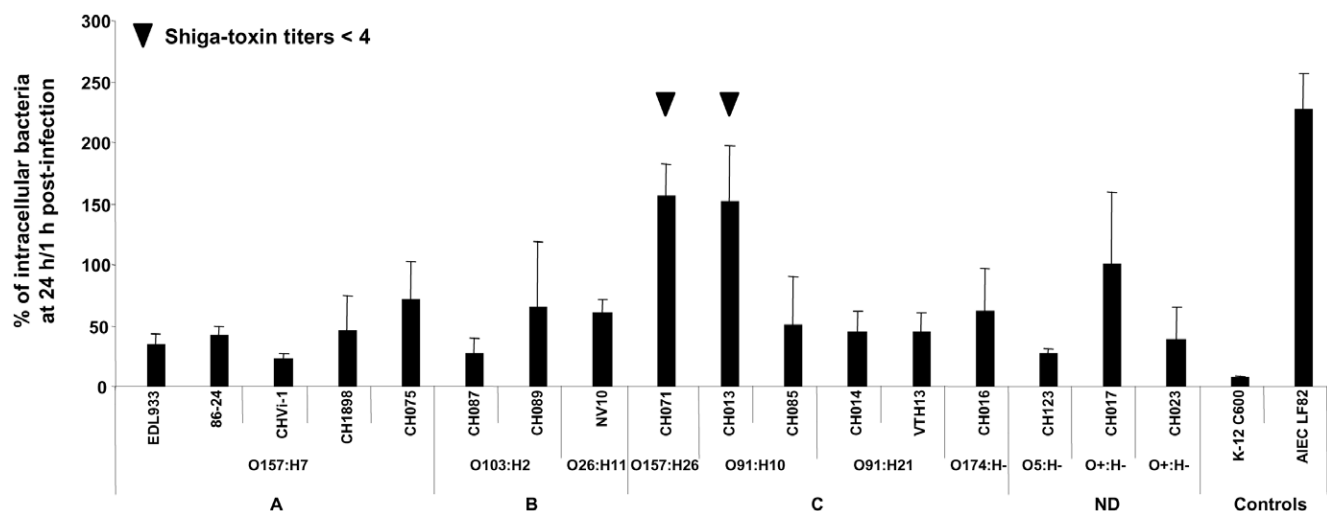
### Statistical analysis

The Student *t*-test was used for unpaired data with a 5% level of significance for the comparison of values. For Ussing chamber experiments, comparisons were made with the unpaired Mann Whitney test.

## Results

### EHEC strains interact *ex vivo* with murine Peyer's patches and *in vivo* with murine M cells

EHEC mucosal translocation across murine ileal mucosa was studied in Ussing chambers. Transmucosal uptake of EHEC 86-24



**Figure 3. Survival and replication of EHEC strains within human THP-1 macrophages at 24 h post-infection.** Results are expressed as the number of intracellular bacteria at 24 h relative to that obtained at 1 h after gentamicin exposure, taken as 100%. A, seropathotype A; B, seropathotype B; C, seropathotype C; ND, seropathotype not determined. All assays were performed independently at least five times. Results are means  $\pm$  Standard Deviation (SD) for the replicate experiments. doi:10.1371/journal.pone.0023594.g003





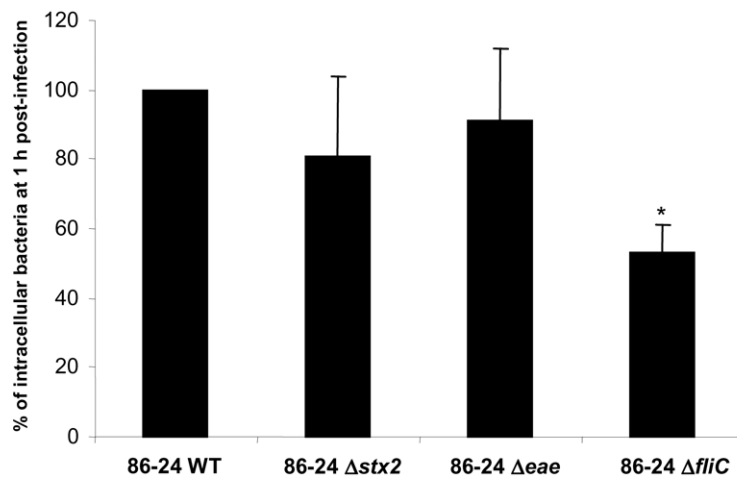
WT bacteria through murine ileal mucosa without PP was very low, even after 5 h of infection (Figure 1A). In contrast, bacterial translocation was observed for ileal biopsies containing PP, reaching a median number of translocating bacteria of  $1.1 \times 10^5$  CFU/mm<sup>2</sup> at 5 h, versus no translocating bacteria for 6 out of 7 ileal mucosa without PP ( $P < 0.05$ ) (Figure 1A). As a control, a non pathogenic *E. coli* strain was not able to translocate across ileal mucosa either with or without PP (Figure 1B). The integrity of ileal mucosa was monitored throughout Ussing chamber experiments: FITC diffusion was limited and there was no difference between Stx-producing bacteria and non pathogenic *E. coli* (Figure S1). To confirm *ex vivo* data, *in vivo* experiments using mouse ileal loop containing one PP were performed. Interestingly,

bloodshot PPs were observed macroscopically in ileal mucosa after a two-hour contact with wild type EHEC. This was not the case with a Stx-negative *E. coli* strain 86-24  $\Delta stx_2$ , nor with the AIEC strain LF82, an invasive *E. coli* pathovar known to target PPs, nor with a non pathogenic *E. coli* strain K-12 C600 (Figure 1C). Confocal analysis revealed that 86-24 WT EHEC bacteria interact with murine M cells (Figure 1D).

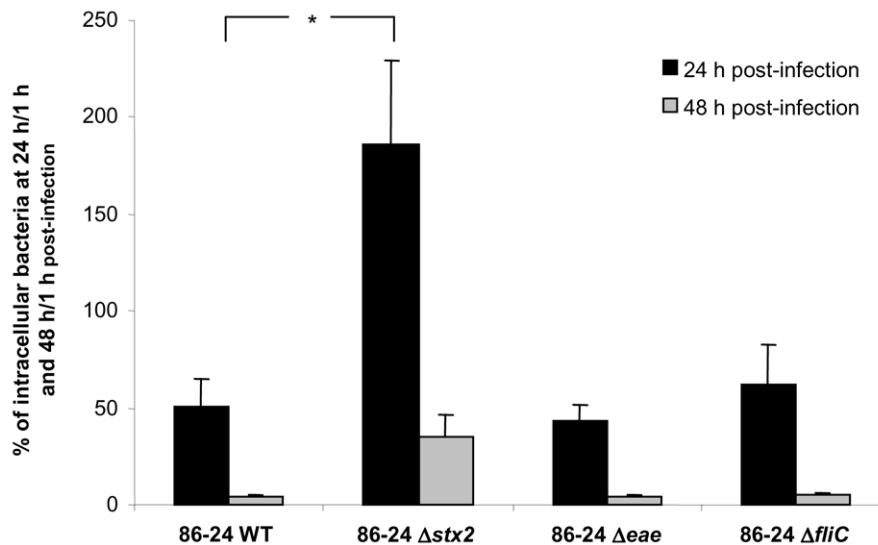
#### EHEC strains are able to translocate across M cells

Since 86-24 WT EHEC interact *in vivo* with murine M cells, we used an *in vitro* model in which human intestinal epithelial cells acquire M cell-like characteristics after being co-cultured with Raji B cells to study bacterial translocation. Experiments were first

**A**



**B**



**Figure 4. Entry and survival of EHEC strains within THP-1 macrophages.** Percentage of intracellular bacteria at 1 h relative to 86-24 WT taken as 100% (A), and percentage of intracellular bacteria at 24 h/1 h and 48 h/1 h post-infection (B) for EHEC 86-24 WT, and 86-24  $\Delta stx_2$ , 86-24  $\Delta eae$ , and 86-24  $\Delta fliC$  isogenic mutants. All assays were performed independently at least four times. Results are means  $\pm$  SD for the replicate experiments. Panel A) \* 86-24  $\Delta fliC$  significantly different from 86-24 WT ( $P < 0.05$ ). Panel B) \* 86-24  $\Delta stx_2$  significantly different from 86-24 WT at 24 h post-infection ( $P < 0.05$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0023594.g004



performed using an *E. coli* 86-24  $\Delta stx_2$  mutant to avoid possible cell death induced by Stx. Translocation of *E. coli* 86-24  $\Delta stx_2$  remained at low levels with the control Caco-2 monolayer [27] ( $4.6 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$  CFU/ml), but increased with time in the *in vitro* M cell model, reaching  $5.1 \times 10^7 \pm 1.7 \times 10^7$  CFU/ml at 5 h post infection ( $P < 0.01$ ) (Figure 2A). The behavior of 86-24 WT and 86-24  $\Delta eae$  mutant was then analyzed and was similar to that of 86-24  $\Delta stx_2$  (Figure 2B), indicating that (i) Stx does not interfere with the co-culture model and (ii) intimin (product of the *eae* gene) is not directly involved in translocation in this model. An additional O157:H7 reference strain (EDL933) and a non-O157 EHEC of serotype O103:H2 (CH087) were also able to translocate across M cells (Figure 2C), supporting the hypothesis that this mechanism could be extended to all EHEC strains. In contrast, the non pathogenic *E. coli* strain K-12 C600 was not able to translocate at levels similar to that of EHEC strains, since only  $7.4 \times 10^4$  CFU/ml were recovered after a 5 h contact with M cells. The translocation of EHEC bacteria was not the result of a loss of the monolayer integrity, since TEER stayed constant during the 5 h of infection (Figure S2).

### EHEC strains can replicate within THP-1 macrophages

The study was performed with 15 EHEC strains isolated from HC/HUS patients and two O157:H7 reference strains (86-24 WT and EDL933). Bacterial uptake, survival and replication in THP-1 cells were measured by the gentamicin protection assay. The non pathogenic *E. coli* strain K-12 C600 was used as a negative control and AIEC strain LF82 (isolated from a patient with Crohn's disease and able to highly replicate within macrophages) as a positive control [28,29]. The number of intracellular bacteria was determined 1 h, 24 h and 48 h post-infection in the presence of gentamicin. The ability of EHEC strains to enter macrophages varied widely from one strain to another. The amount of intracellular bacteria at 1 h post-infection ranged from  $1.7 \times 10^4$  CFU/well for CH016, to  $5.8 \times 10^5$  CFU/well for CH015 (data not shown). The ability to enter macrophages was not related to serotype or belonging to a seropathotype.

Survival or replication of EHEC strains at 24 h post-infection was expressed as a percentage compared to the number of bacteria at 1 h, defined as 100%. The nonpathogenic *E. coli* K-12 C600 control strain was slowly but efficiently killed following phagocytosis by THP-1 cells: only 7% of the bacteria initially internalized were recovered at 24 h post-infection, evidence of the bactericidal activity of the THP-1 macrophages (Figure 3). All EHEC strains were able to survive within macrophages after 24 h. Compared to those of the negative control (*E. coli* K-12 C600), the percentages of survival were higher, ranging from 23% for CHVi-1 to 155% for CH071. However, in contrast with what was observed for the positive control (AIEC strain LF82), the number of intracellular bacteria at 24 h post-infection was smaller than at 1 h post-infection (less than 100%) in all but two strains (CH013 and CH071). No link was found between the ability of strains to survive/replicate and their serotype. After investigating the ability of strains to express Stx, we observed that the strains able to replicate within macrophages no longer expressed Stx (Stx titers  $< 4$ , see Figure 3).

To confirm that Stx play a role in the ability of EHEC strains to survive and/or replicate within macrophages, *stx* isogenic mutants of the O157:H7 reference strains 86-24 WT and EDL933 were used. For 86-24 WT, the number of bacteria internalized after 1 h, defined as 100%, was  $2.1 \times 10^5$  CFU/well (Figure 4A), and the survival rate was 51%, indicating that the level of intracellular bacteria was two-fold lower after 24 h than after 1 h (Figure 4B). The entry of the 86-24  $\Delta stx_2$  mutant was slightly less than that of the wild type (81%, Figure 4A), but the percentage of survival was

186% (Figure 4B), indicating that the number of intracellular bacteria had almost doubled compared to time 1 h. The behavior of the isogenic  $\Delta eae$  mutant did not differ from that of the 86-24 WT strain. Interestingly, the percentage of survival at 48 h post-infection was low for all the strains tested, around 5% for Stx-producing strains and 35% for  $\Delta stx_2$  mutants and non-Stx-producing bacteria. Identical results were obtained with EDL933 and its isogenic  $\Delta stx$  and  $\Delta eae$  mutants (data not shown).

### Cytotoxic effects of EHEC infection on THP-1 macrophages

To check if EHEC were able to produce Stx within macrophages, supernatants of infected THP-1 cells were tested using a Vero toxin assay. High amounts of Stx were recovered from THP-1 macrophages infected with EHEC 86-24 WT and EDL933: the cytotoxic titer was 1/256 (1/2<sup>8</sup>) and the average amount of toxin was estimated to be  $8.2 \pm 1.8$  ng/ml. As expected, no cytotoxic effect was observed in the supernatants of THP-1 infected with a non pathogenic *E. coli* strain or the 86-24  $\Delta stx_2$  mutant (Table 2).

Culture supernatants of infected macrophages were assayed for the presence of the cytoplasmic LDH to estimate the membrane integrity of the cells and the cytotoxic effect of EHEC strains. The amounts of LDH released were expressed as LDH activity recovered in the supernatant relative to LDH activity of total cell lysis defined as 100%. Infection of THP-1 cells with wild type 86-24 EHEC strain resulted in high release of LDH, which reached 20% at 24 h post-infection (Figure 5A). In contrast, the amounts of LDH released from  $\Delta stx_2$ -infected macrophages were significantly lower than those of cells infected with the 86-24 WT strain ( $P < 0.05$ ). Since Stx have been shown to induce apoptosis in epithelial, endothelial and monocytic cells [30,31], we decided to perform fluorescence microscopy analysis of THP-1 nucleus stained with Hoechst. Unlike the 86-24  $\Delta stx_2$  mutant, macrophages infected with 86-24 WT for 24 h had fragmented nuclei, characteristic of apoptotic cells (Figure 5B). Quantifications of apoptotic cells are shown in Figure 5C. After a 4-h to 24-h infection, 86-24 WT increased the percentage of apoptotic cells, compared with cells infected with the  $\Delta stx_2$  mutant or non infected (NI) cells ( $P < 0.05$ ). At 24 h, the percentage of apoptotic cells reached 5% of the remaining cells, compared to 0.3% and 0.1% with the  $\Delta stx_2$  mutant and non infected cells, respectively ( $P < 0.05$ ).

Morphological data to confirm the cytotoxic effects and survival of EHEC wild type strain and the  $\Delta stx_2$  mutant within THP-1 cells were obtained with confocal microscopy and TEM. One hour

**Table 2.** Quantification of Stx released after THP-1 infections.

Strains	Cytotoxic titer <sup>a</sup>	Stx concentration <sup>b</sup> (ng/ml)
86-24 WT	1/256	$8.2 \pm 1.8$
86-24 $\Delta stx_2$	-	0
86-24 $\Delta eae$	-	0
EDL933	1/256	$8.2 \pm 1.8$
K-12 C600	-	0

<sup>a</sup>The verotoxin titer was expressed as the reciprocal of the highest sample dilution which caused 50% cell detachment after 24 h of incubation.

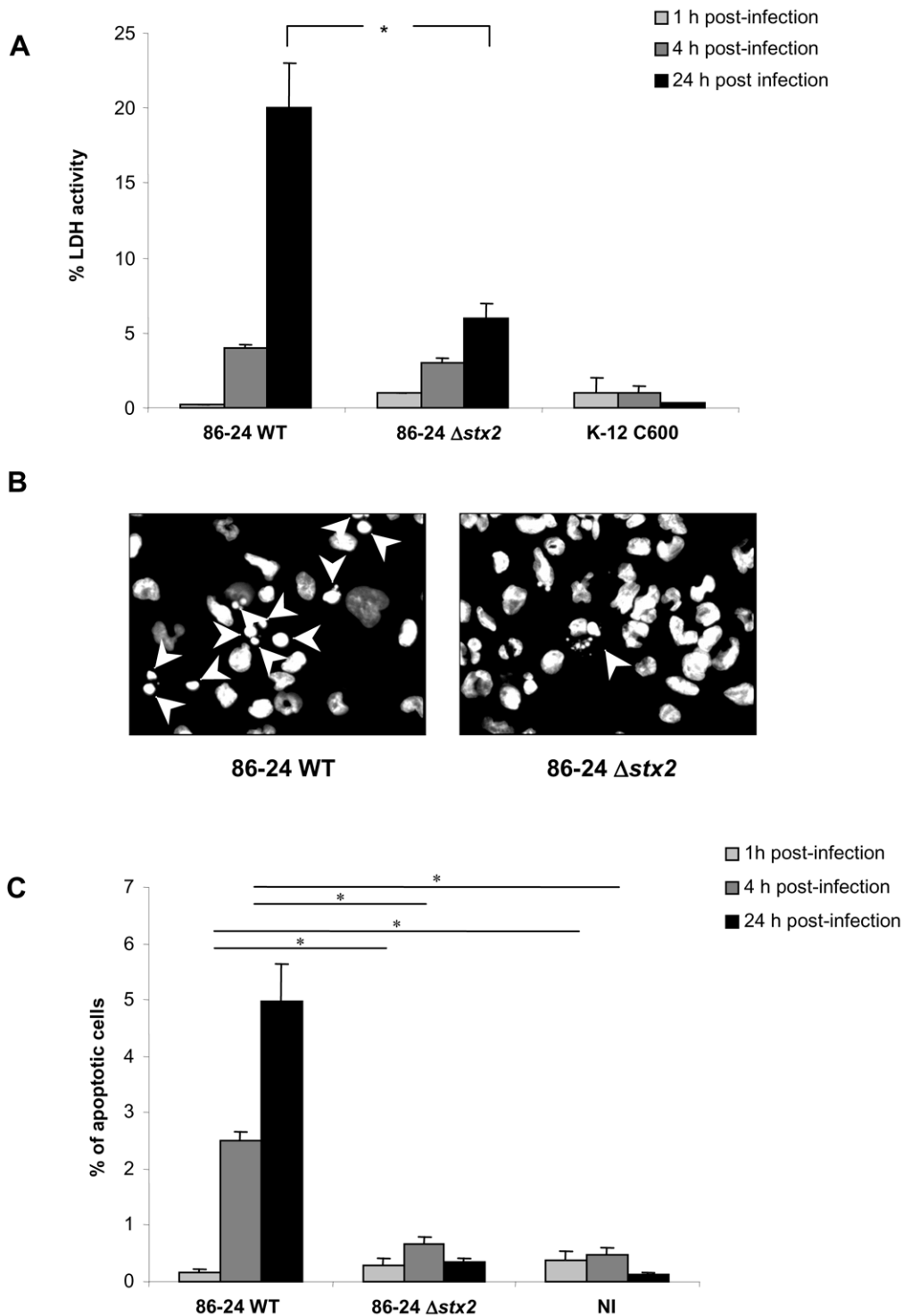
<sup>b</sup>Stx concentration in the supernatant of infected THP-1 macrophages.

The results of 3 independent sets of data are presented.

-, no cytotoxic effect.

doi:10.1371/journal.pone.0023594.t002





**Figure 5. Induction of apoptosis in THP-1 macrophages infected by EHEC strains.** Percentage of lactate dehydrogenase (LDH) activity at 1 h, 4 h, and 24 h post-infection (A). Fluorescence microscopy analysis of 86-24 WT and 86-24  $\Delta$ stx2 infected THP-1 macrophages stained with Hoechst at 24 h post-infection. Arrowheads indicate the fragmented nuclei of apoptotic cells (B). Quantification of apoptosis in infected THP-1 stained with Hoechst (C). Results are expressed as percentage of apoptotic cells numbered by microscopy observation. Results are mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. NI, non infected. Panel A) \* 86-24  $\Delta$ stx2 significantly different from 86-24 WT at 24 h ( $P < 0.05$ ). Panel C) 86-24  $\Delta$ stx2 and NI significantly different from 86-24 WT at 4 h and 24 h (\*) ( $P < 0.05$ ). doi:10.1371/journal.pone.0023594.g005

after infection, whatever the strain, many macrophages were infected with only a few bacteria present in small vacuoles (Figure 6A and C). At 24 h post-infection with 86-24 WT, cell

layers were damaged and very few bacteria were found within macrophages (Figure 6D), suggesting that Stx production had driven the cells to apoptosis and release of intracellular bacteria



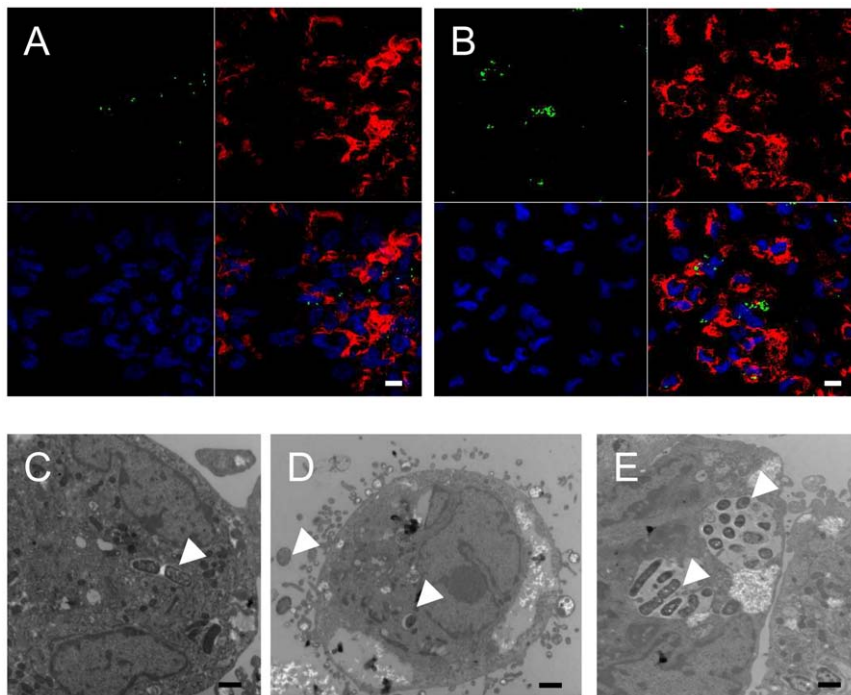
into the antibiotic containing media. In contrast, THP-1 macrophages infected with the 86-24  $\Delta stx_2$  mutant contained many bacterial clusters (Figure 6B and E), indicating that non-Stx-producing bacteria were able to replicate within macrophages; no morphological evidence of cytotoxicity was observed, confirming LDH release results.

## Discussion

EHEC O157:H7 are one of the most common pathogens involved in large outbreaks of severe gastrointestinal illnesses around the world [2,6]. EHEC are implicated in a wide spectrum of clinical outcomes ranging from nonbloody diarrhea to HC and HUS. Stx, one of the major virulence factors produced by EHEC, plays an important role in the development of complications such as HUS [3]. To cause human illness, orally ingested EHEC must survive the acidic environment of the stomach [3]. However, recent studies evaluating the survival of an *E. coli* O157:H7 strain in a simulated *in vitro* model of human digestive tract, revealed a bacterial mortality in the stomach and duodenum. A bacterial growth was observed in the distal parts of the small intestine, suggesting that high levels of bacteria could be present in the ileum and in the colon [32]. EHEC are thought to colonize the colonic mucosa but do not invade deeper layers of the mucosa or spread systemically. Studies conducted using human intestinal IVOC have revealed a preferential tropism of EHEC for the FAE overlying ileal PPs, which is associated with a lack of colonic adhesion [12,16,17]. EHEC can induce A/E lesions on IVOC prepared from bovine ileum [16], but the principal site of colonization of EHEC O157:H7 is the lymphoid follicle-dense

mucosa at the terminal rectum in the bovine host [24]. If EHEC target FAE, we hypothesized that the uptake of bacteria by M cells and underlying macrophages, which is observed for some pathogenic bacteria, may be the first step in EHEC translocation and subsequent toxin transport across the intestinal barrier.

It is now well documented that invasive members of the *Enterobacteriaceae* family, such as *Salmonella*, *Shigella* or AIEC, use M cells as the initial point of interaction with the host mucosa [18,20,22,23,33]. M cells transcytosis has been studied *in vitro* using a procedure to differentiate human intestinal epithelial cells (Caco-2) into M cells by co-culture with Raji B lymphocytes. This model exhibits morphological and functional characteristics of M cells, such as loss of microvilli, downregulation of brush-border enzymes, upregulation of particle transport, and enhanced translocation of pathogens [26,27]. *Salmonella* translocation across this co-culture model was greater than in Caco-2 control monolayers, while translocation of EPEC, *Listeria monocytogenes* or *Clostridium difficile* was not enhanced in M cells compared to Caco-2 [18,34]. We show here for the first time that EHEC strains, including O157:H7 and non-O157 serotypes, are able to significantly translocate through M cell monolayers compared to Caco-2 monolayers. A non pathogenic *E. coli* strain was not able to translocate at levels similar to that of EHEC strains. The high level of EHEC translocation through M cells is not a result of the loss of monolayer integrity, since the transepithelial electrical resistance of M cell monolayers was not modified after infection neither with EHEC strains 86-24 WT and EDL 933, nor with a non pathogenic *E. coli*. The Ussing chamber system is also a useful model of *ex vivo* intact organ culture to study mechanisms of bacterial translocation and the pathogenesis of enteric infections.



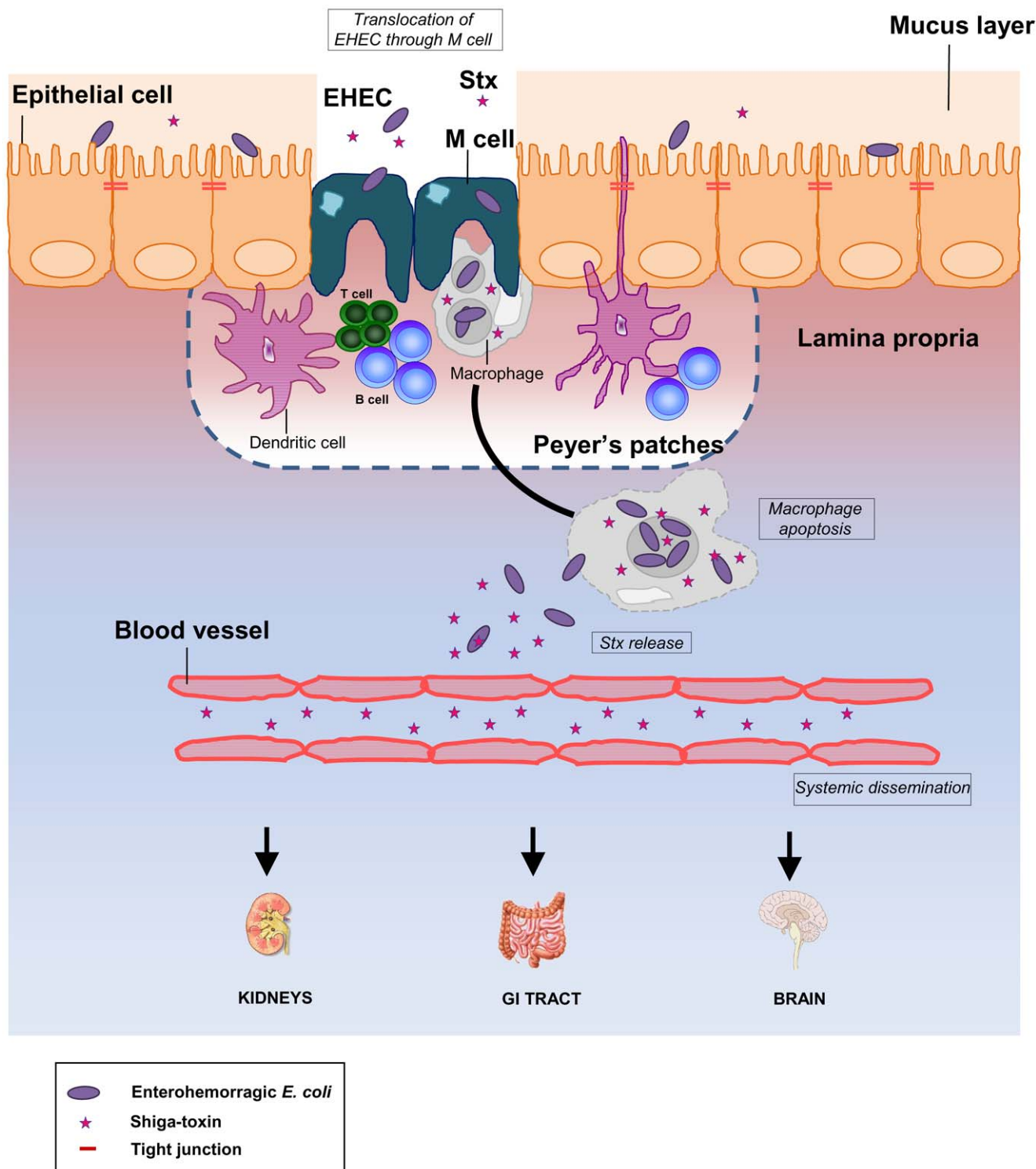
**Figure 6. Survival and cytotoxic effects of EHEC strains within THP-1 macrophages.** Confocal microscopy (A and B) and Transmission Electron Microscopy (TEM) (C, D, and E) analysis of THP-1 macrophages infected with EHEC strains. THP-1 macrophages were infected with the 86-24 WT strain (A, C and D) and with the 86-24  $\Delta stx_2$  isogenic mutant (B and E) at 1 h post-infection (A and C) and at 24 h post-infection (B, D and E). For confocal micrographs, THP-1 macrophages were infected with GFP-positive 86-24 WT and 86-24  $\Delta stx_2$  isogenic mutant (green color). The actin cytoskeleton of cells was stained with TRITC phalloidin (red), and DNA was stained with DAPI (blue). Arrowheads indicate bacteria within THP-1 macrophages. Scale bar = 10  $\mu$ m (A and B). Scale bar = 1  $\mu$ m (C, D and E). doi:10.1371/journal.pone.0023594.g006





Transmucosal uptake of EHEC strain 86-24 WT was confirmed and we observed high levels of bacterial translocation through murine ileal mucosa containing PP, whereas very few bacteria

crossed the ileal mucosa in the absence of PP. *In vivo* ileal loop assays confirmed a specific targeting of EHEC to FAE overlying PP regions. Taken together, our *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*



**Figure 7. New working model for EHEC infection in humans.** The diagram shows a monolayer of intestinal epithelial cells with EHEC infection in the lumen. Stx production occurs in the intestine. The bacteria cross the intestinal barrier through M cells. In the *lamina propria*, bacteria enter, survive, and produce Stx within resident macrophages. Following replication of bacteria in macrophages, extensive Stx production induces host cell death. Subsequently, released Stx could cross the downstream blood vessels to reach the kidneys, intestine, and brain. Damage to these organs results in serious life-threatening complications in humans. doi:10.1371/journal.pone.0023594.g007



experiments demonstrate that EHEC strains target M cells on the surface of PPs in order to translocate across the epithelial barrier. Moreover, we describe for the first time that a two-hour contact with wild type EHEC induces hemorrhagic lesions in PPs in ileal loop assays, whereas such phenomenon is not found for AIEC strain LF82, an invasive *E. coli* pathovar known to target PPs [23]. A Stx-negative mutant is not able to induce bloodshot in ileal loop, which confirms the well known role of Stx in hemorrhagic lesions.

The molecular mechanisms that mediate the transport of bacteria across M cells remain unclear, and the bacterial effectors involved have not yet been totally identified. Intimin types might play a role in determining the pattern of colonisation and tissue tropism in the host, and intimin  $\gamma$  appears to restrict colonization of O157:H7 strains to human FAE [16]. Moreover, intimin  $\gamma$  binds  $\beta$ 1-integrins, which are expressed on the apical surface of M cells [35]. Contrary to expectations, deletion of the *eae* gene in strain 86-24 did not alter translocation rates in our M cell model (Figure 2B) whereas the mutant was impaired in its capacity to adhere to epithelial intestinal cells (data not shown). Our results indicate that the LEE encoded genes may not promote translocation across M cells in EHEC. The long polar fimbriae (LPF), encoded by the *lpf* operon, play a key role in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [36] and in AIEC [23] to mediate bacterial interactions with M cells. The *lpf* operon was detected in an O91:H21 HUS associated strain, using a genomic subtractive hybridization procedure to identify virulence DNA sequences [37], and the complete genome sequence of O157:H7 strains revealed the presence of two *lpf* operons [38,39]. Their expression is tightly regulated, and LPF were reported to be associated with adherence in EHEC O157:H7 to cultured epithelial cells [40]. However, deletion of one or both of the *lpf* operons in O157:H7 did not reduce FAE adhesion but enhanced colonization to small intestine, suggesting that LPF do not promote the targeting of PP in EHEC O157:H7 [41].

The enteric pathogens crossing the FAE are captured by resident macrophages and subepithelial dendritic cells in the dome of the lymphoid follicle [19]. In this study, we analyzed the entry, survival and proliferation of 17 EHEC strains and isogenic mutants in human THP-1 macrophages. We showed that EHEC were able to survive within macrophages for 24 h and to produce Stx, thereby inducing cell apoptosis of THP-1 macrophages and toxin release. Studies using human epithelial, endothelial and monocytic cell lines have shown that purified Stx induce apoptotic cell death *in vitro* [31]. The mechanism of Stx-induced apoptosis in the human myeloid leukaemia cell line THP-1 involves the increased expression of DR5 and TRAIL and activation of caspase-8 *via* a calpain-dependent mechanism through endoplasmic reticulum stress response [30,31]. Furthermore, Stx encoding genes were seen to be up-regulated in intracellular bacteria [42].

Stx1 and Stx2 are able to cross polarized intestinal epithelial cells *via* a transcellular process and to remain biologically active after translocation, and it was shown that neutrophil transmigration enhanced the translocation of Stx, probably by opening a non-specific paracellular pathway across a polarized monolayer of T84 epithelial cells [43]. Here we propose an alternative pathway for Stx translocation *via* bacterial uptake by M cells and underlying macrophages. After bacterial uptake by M cells, Stx induce apoptosis in underlying infected macrophages, which leads to EHEC and toxin release in the *lamina propria*. In our experimental conditions, the average survival rate for the 86-24 wild type strain was only 51% because bacteria released into the antibiotic containing media were killed. In contrast *in vivo*, EHEC strains could be released in the *lamina propria*. We found that EHEC were able to replicate within THP-1 macrophages after 24 h but were killed after 48 h, unlike AIEC LF82 strain, which was still able to

replicate within macrophages [28,29]. More and more bacterial pathogens are observed to be able to translocate across the FAE *via* M cells, but their fate varies greatly depending on the pathogen. *Salmonella*, which are able to survive within macrophage, can spread throughout the organism, leading to bacteraemia and to systemic diseases. In contrast, infections due to *Shigella* or AIEC are restricted to the digestive tract. *In vivo*, EHEC could be eventually killed and therefore would not invade deeper layers of the mucosa, but the toxins released could gain access to the systemic circulation. The amount of toxin that translocates across intestinal epithelia is probably one of the most important factors in determining the development of systemic complications.

As observed with *Shigella*, the infectious dose for *E. coli* O157:H7 estimated from outbreak data is considered to be as low as 1 to 100 organisms [3]. The targeting of bacteria to M cells and subsequent capture by macrophages could explain why only a small amount of bacteria would be sufficient to trigger disease, which determines, in part, the efficiency of the infection and the low infectious dose. We propose a new model for EHEC infection in humans (Figure 7) and suggest that bacteria cross the intestinal barrier through M cells overlying PPs. In the *lamina propria*, bacteria could enter, survive, and produce Stx within resident macrophages, inducing host cell apoptosis. In this case, however, bacteria would be eventually killed without causing bacteraemia. Subsequently, released Stx would cross the downstream blood vessels to reach the kidneys, intestine, and brain leading to severe disease in humans. The study of the relationships between interactions with M cells and the development of disease could help in designing novel therapeutic approaches to EHEC infection.

## Supporting Information

**Figure S1 Integrity of murine ileal mucosa determined by monitoring of FITC diffusion.** The mucosal integrity was monitored *ex vivo* in Ussing chambers by following FITC diffusion after infection with EHEC strain 86-24 WT and non pathogenic *E. coli* strain MG1655. Murine mucosa was isolated from the ileum, with Peyer's Patches (PP) (86-24 WT ■ and MG1655 □) or without PP (86-24 WT ● and MG1655 ○) placed in Ussing chambers during a 5-hour contact. One representative set of data is presented. (TIF)

**Figure S2 Integrity of cell monolayers determined by trans-epithelial resistance (TEER) measurement.** TEER was monitored during a 5-hour infection in Caco-2 (A) and M cell monolayers (B), infected with EHEC strains 86-24 WT (Caco-2 ▲ and M cells △), and EDL 933 (Caco-2 ● and M cells ○) or with a non pathogenic *E. coli* K-12 C600 (Caco-2 ■ and M cells ◇). (TIF)

## Acknowledgments

We thank Nicolas Barnich for his help with Ussing chamber, and Muriel Millet for her help in experiments with THP-1 macrophages. We thank Christelle Blavignac, Claire Szczepaniak and Lorraine Gameiro from the Centre Imagerie Cellulaire Santé (CICS, Université d'Auvergne) for technical assistance with electron microscopy and the Imagerie Confocale Clermont-Ferrand (ICCF) platform for confocal microscopy. We acknowledge the useful help of Jeffrey Watts in the editing of the manuscript.

## Author Contributions

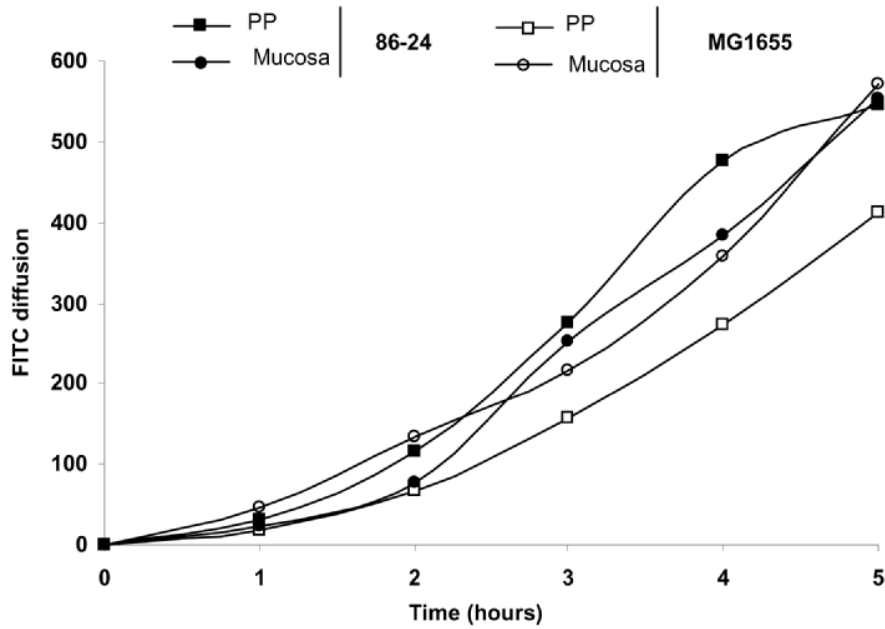
Conceived and designed the experiments: LE-M BC PS JD AD-M NP VL. Performed the experiments: LE-M BC PS JD NP. Analyzed the data: LE-M BC PS JD SB-D AD-M NP VL. Contributed reagents/materials/analysis tools: LE-M BC PS JD SB-D AD-M NP VL. Wrote the paper: LE-M NP VL.



## References

- Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, et al. (2011) Epidemic profile of Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany - Preliminary Report. *N Engl J Med*, In press.
- Struelens M, Palm D, Takkinen J (2011) Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak: new microbiological findings boost coordinated investigations by European public health laboratories. *Euro Surveill* 16.
- Paton JC, Paton AW (1998) Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 11: 450–79.
- Pradel N, Livrelli V, De Champs C, Palcoux JB, Reynaud A, et al. (2000) Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J Clin Microbiol* 38: 1023–31.
- Beutin L (2006) Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53: 299–305.
- Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL (2005) Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerg Infect Dis* 11: 603–9.
- Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, et al. (2003) Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol* 41: 4930–40.
- Johannes L, Romer W (2009) Shiga toxins: from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* 8: 105–16.
- DeVinney R, Puente JL, Gauthier A, Goosney D, Finlay BB (2001) Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. *Mol Microbiol* 41: 1445–58.
- Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, et al. (1998) Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* 30: 911–21.
- Tree JJ, Wolfson EB, Wang D, Roe AJ, Gally DL (2009) Controlling injection: regulation of type III secretion in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* 17: 361–70.
- Fitzhenry RJ, Pickard DJ, Hartland EL, Reece S, Dougan G, et al. (2002) Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Gut* 50: 180–5.
- Pradel N, Bertin Y, Martin C, Livrelli V (2008) Molecular analysis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients and dairy samples in France. *Appl Environ Microbiol* 74: 2118–28.
- Mahajan A, Currie CG, Mackie S, Tree J, McAteer S, et al. (2009) An investigation of the expression and adhesion function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with bovine intestinal epithelium. *Cell Microbiol* 11: 121–37.
- Berlin MC, Darfeuille-Michaud A, Egan IJ, Miyamoto Y, Kagnoff MF (2002) Role of EHEC O157:H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF- $\kappa$ B and MAP kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8. *Cell Microbiol* 4: 635–48.
- Phillips AD, Navabpour S, Hicks S, Dougan G, Wallis T, et al. (2000) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut* 47: 377–81.
- Chong Y, Fitzhenry R, Heuschkel R, Torrente F, Frankel G, et al. (2007) Human intestinal tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7- initial colonization of terminal ileum and Peyer's patches and minimal colonic adhesion *ex vivo*. *Microbiology* 153: 794–802.
- Sansonetti PJ (2004) War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol* 4: 953–64.
- Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, et al. (2009) Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462: 226–30.
- Martinez-Argudo I, Jepson MA (2008) *Salmonella* translocates across an *in vitro* M cell model independently of SPI-1 and SPI-2. *Microbiology* 154: 3887–94.
- Inman LR, Cantey JR (1983) Specific adherence of *Escherichia coli* (strain RDEC-1) to membranous (M) cells of the Peyer's patch in *Escherichia coli* diarrhea in the rabbit. *J Clin Invest* 71: 1–8.
- Roberts CL, Keita AV, Duncan SH, O'Kennedy N, Söderholm JD, et al. (2010) Translocation of Crohn's disease *Escherichia coli* across M-cells: contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers. *Gut* 59: 1331–9.
- Chassaing B, Rolhion N, de Vallée A, Salim SY, Prorok-Hamon M, et al. (2011) Crohn's disease-associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* target murine and human Peyer's Patches via Long Polar Fimbriae. *J Clin Invest* 121: 966–75.
- Naylor SW, Low JC, Besser TE, Mahajan A, Gunn GJ, et al. (2003) Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infect Immun* 71: 1505–12.
- Hitotsubashi S, Fujii Y, Yamanaka H, Okamoto K (1992) Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Infect Immun* 60: 4468–74.
- Kerneis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl JP, Pringault E (1997) Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* 277: 949–52.
- Gullberg E, Leonard M, Karlsson J, Hopkins AM, Brayden D, et al. (2000) Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M-cell model. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 808–13.
- Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, Perruchot MH, Colombel JF, et al. (2001) Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun* 69: 5529–37.
- Bringer MA, Glasser AL, Tung CH, Meresse S, Darfeuille-Michaud A (2006) The Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. *Cell Microbiol* 8: 471–84.
- Lee SY, Cherala RP, Tesh VL (2007) Simultaneous induction of apoptotic and survival signaling pathways in macrophage-like THP-1 cells by Shiga toxin 1. *Infect Immun* 75: 1291–302.
- Lee SY, Lee MS, Cherala RP, Tesh VL (2008) Shiga toxin 1 induces apoptosis through the endoplasmic reticulum stress response in human monocytic cells. *Cell Microbiol* 10: 770–80.
- Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Privat M, Denis S, Cardot JM, et al. (2011) Effect of a new probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in a dynamic gastrointestinal model. *Appl Environ Microbiol* 77: 1127–31.
- Jones BD, Ghori N, Falkow S (1994) *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 180: 15–23.
- Martinez-Argudo I, Sands C, Jepson MA (2007) Translocation of enteropathogenic *Escherichia coli* across an *in vitro* M cell model is regulated by its type III secretion system. *Cell Microbiol* 9: 1538–46.
- Hamzaoui N, Kerneis S, Caliot E, Pringault E (2004) Expression and distribution of beta1 integrins in *in vitro*-induced M cells: implications for *Yersinia* adhesion to Peyer's patch epithelium. *Cell Microbiol* 6: 817–28.
- Baumler AJ, Tsolis RM, Hefron F (1996) The *lyf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella* Typhimurium to murine Peyer's patches. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 279–83.
- Pradel N, Leroy-Setrin S, Joly B, Livrelli V (2002) Genomic subtraction to identify and characterize sequences of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91:H21. *Appl Environ Microbiol* 68: 2316–25.
- Perna NT, Plunkett G, 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, et al. (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409: 529–33.
- Doughty S, Sloan J, Bennett-Wood V, Robertson M, Robins-Browne RM, et al. (2002) Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 70: 6761–9.
- Torres AG, Slater TM, Patel SD, Popov VL, Arenas-Hernandez MMP (2008) Contribution of the Ler- and H-NS-Regulated Long Polar Fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 during Binding to Tissue-Cultured Cells. *Infect Immun* 76: 5062–71.
- Fitzhenry R, Dahan S, Torres AG, Chong Y, Heuschkel R, et al. (2006) Long polar fimbriae and tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7. *Microbes Infect* 8: 1741–9.
- Poirier K, Faucher SP, Beland M, Brousseau R, Gannon V, et al. (2008) *Escherichia coli* O157:H7 survives within human macrophages: global gene expression profile and involvement of the Shiga toxins. *Infect Immun* 76: 4814–22.
- Hurley BP, Thorpe CM, Acheson DW (2001) Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect Immun* 69: 6148–55.
- Tarr PI, Neill MA, Clausen CR, Newland JW, Neill RJ, et al. (1989) Genotypic variation in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 isolated from patients in Washington, 1984–1987. *J Infect Dis* 159: 344–7.
- Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, et al. (1998) Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115: 1405–13.
- Valdivia RH, Hromockyj AE, Monack D, Ramakrishnan L, Falkow S (1996) Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. *Gene* 173: 47–52.

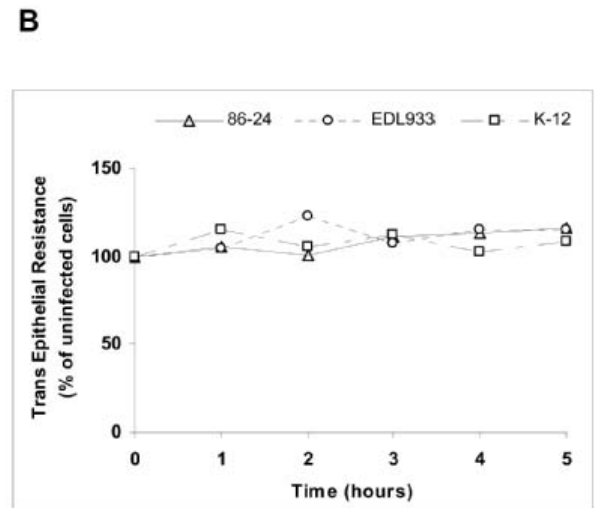
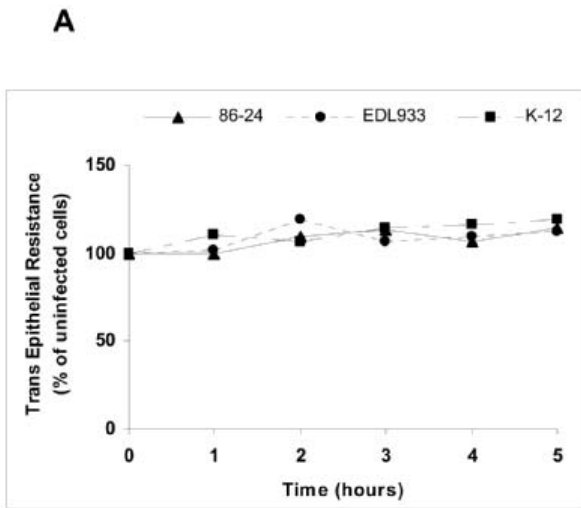




**Figure S1 : Integrity of murine ileal mucosa determined by monitoring of FITC diffusion.** The mucosal integrity was monitored *ex vivo* in Ussing chambers by following FITC diffusion after infection with EHEC strain 86-24 WT and non pathogenic *E. coli* strain MG1655. Murine mucosa was isolated from the ileum, with Peyer's Patches (PP) (86-24 WT ■ and MG1655 □ ) or without PP (86-24 WT ● and MG1655 ○) placed in Ussing chambers during a 5-hour contact. One representative set of data is presented.







**Figure S1 : Integrity of cell monolayers determined by trans-epithelial resistance (TEER) measurement.** TEER was monitored during a 5-hour infection in Caco-2 (A) and M cell monolayers (B), infected with EHEC strains 86-24 WT (Caco-2 ▲ and M cells △), and EDL 933 (Caco-2 • and M cells ○) or with a non pathogenic E. coli K-12 C600 (Caco-2 ■ and M cells ◇).





## Résumé

La maladie de Crohn (MC) est une affection inflammatoire chronique du tube digestif dont l'étiologie est multifactorielle. Les lésions iléales des patients atteints de MC sont anormalement colonisées par des souches pathogènes de *Escherichia coli* appartenant au pathovar AIEC pour « *Adherent-Invasive E. coli* ». Ces souches sont capables d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales, et ont la capacité de survivre et de se multiplier fortement en macrophages en induisant une synthèse intense de TNF- $\alpha$ . L'objectif de ce travail s'inscrit dans la compréhension des mécanismes permettant aux bactéries AIEC de coloniser la muqueuse intestinale et d'induire les stades précoces de la pathologie.

Une précédente étude menée au laboratoire avait permis de mettre en évidence l'importance de l'activation de la voie de régulation dépendante du facteur bactérien sigma alternatif RpoE (ou  $\sigma^E$ ) dans le processus d'adhésion et d'invasion des cellules épithéliales intestinales par la souche AIEC de référence LF82 via l'expression des pili de type 1 et des flagelles. En continuité de ces travaux, nous montrons que l'activation de la voie de signalisation dépendante du facteur  $\sigma^E$  est également primordiale pour la capacité des souches AIEC à former des biofilms, et une analyse bioinformatique ayant pour but d'identifier les gènes régulés par  $\sigma^E$  a montré que l'opéron *waaWVL*, impliqué dans la biosynthèse du lipopolysaccharide, est primordial pour la formation de biofilm par les souches AIEC.

De plus, nous avons mis en évidence que les *long polar fimbriae* (LPF) sont impliqués dans le ciblage de l'épithélium associé aux plaques de Peyer par les bactéries AIEC, et ceci en leur permettant de cibler spécifiquement les cellules M. L'inactivation du gène *Nod2*, gène de susceptibilité à la MC, conduit à une augmentation du nombre de plaques de Peyer ainsi que des cellules M à leur surface, indiquant que les bactéries AIEC pourraient tirer avantage d'une susceptibilité génétique pour cibler les plaques de Peyer.