



HAL
open science

Portage fécal du pathovar *Escherichia coli* adhérent et invasif (AIEC) chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et des témoins sains

Oumaïra Rahmouni

► To cite this version:

Oumaïra Rahmouni. Portage fécal du pathovar *Escherichia coli* adhérent et invasif (AIEC) chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et des témoins sains. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2018. Français. NNT : 2018LILUS012 . tel-02006741

HAL Id: tel-02006741

<https://theses.hal.science/tel-02006741>

Submitted on 4 Feb 2019

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 DE LILLE

ECOLE DOCTORALE : Biologie Santé

SPECIALITE : Microbiologie

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Portage fécal du pathovar *Escherichia coli* adhérent et invasif (AIEC) chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et des témoins sains.

Présentée et soutenue publiquement par

Mlle Oumaïra RAHMOUNI

Le 18 Septembre 2018

Thèse dirigée par le Dr Christel NEUT et le Pr Benjamin PARIENTE,

Membres du jury :

Mr le Pr FLOURIE Bernard, Rapporteur

Mme le Pr GANGLOFF Sophie, Rapporteur

Mme le Dr MARTINEZ-MEDINA Margarita

Mr le Pr DESREUMAUX Pierre

Mr le Pr PARIENTE Benjamin

Mme le Dr NEUT Christel

Thèse effectuée au sein du laboratoire dirigé par le Pr Pierre Desreumaux : Lille Inflammation Research International Center (LIRIC)

Équipe 1 : Maladies inflammatoires digestives – Physiopathologie et développement de nouvelles cibles thérapeutiques.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères aux membres du jury de thèse qui ont bien accepté de juger et d'analyser mon travail de recherche. Merci pour leur présence, pour leur lecture attentive de ma thèse ainsi que pour les remarques qu'ils m'adresseront lors de cette soutenance afin d'améliorer mon travail.

Monsieur le Professeur Bernard FLOURIE et Madame le Professeur Sophie GANGLOFF pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit et d'évaluer ce travail de thèse.

Madame le Docteur Margarita MARTINEZ-MEDINA pour avoir accepté d'être examinateur pour ma soutenance de thèse.

Je tiens à exprimer mes plus profonds et sincères remerciements à Monsieur le Professeur Pierre DESREUMAUX et à Madame le Docteur Christel NEUT pour m'avoir donné l'opportunité de poursuivre en thèse au sein de votre équipe de recherche, cela a été un réel plaisir de vous côtoyer et de travailler à vos côtés. Je vous exprime également ma profonde reconnaissance et gratitude pour votre aide dans l'avancement de ce projet de recherche, dans la recherche de financements, dans la constitution des membres du jury, merci également pour vos nombreux précieux conseils, vos enseignements, votre disponibilité, votre confiance et votre soutien dans mes démarches professionnelles. Merci également de m'avoir donné l'opportunité de valoriser ce projet de recherche lors de congrès et de séminaires.

Madame le Docteur Christel NEUT pour avoir accepté d'être ma directrice de thèse, pour m'avoir fait confiance, pour votre encadrement durant mes années de recherche et pour votre accueil au sein du laboratoire. J'ai eu la chance de vous côtoyer et de travailler à vos côtés depuis mes débuts en tant que stagiaire en DU et de poursuivre et finaliser mon cursus universitaire doctoral au sein de votre équipe. Durant ces 6 années à vos côtés, j'ai pu travailler sur différents projets tout aussi intéressants les uns que les

autres, j'ai ainsi pu développer différentes compétences et je vous en remercie de m'avoir donné cette opportunité. Merci pour le temps consacré et pour vos enseignements.

Monsieur le Professeur Benjamin PARIENTE pour avoir accepté d'être mon co-directeur de thèse d'Université et pour vos disponibilités. Merci pour votre temps consacré et pour les nombreux conseils et aide précieuse dans l'avancement de ce projet.

Monsieur le Docteur Nicolas BARNICH et Monsieur le Docteur Christophe FLAHAUT pour avoir participé à mes comités de suivi de thèse, et aux échanges qui ont permis l'avancement de ce projet de recherche.

Nous ne faisons pas de nouvelles rencontres par accident. Elles sont destinées à rencontrer notre chemin pour une raison.

Je souhaiterais dédicacer cette citation à certaines personnes qui ont contribué pour beaucoup à mon orientation et épanouissement professionnels. Je vais d'abord commencer par remercier très sincèrement Marie-Françoise ODOU pour ton soutien indéniabte, ta patience, ton extrême gentillesse, ta douceur, ton aide préciseuse, ta bonne humeur, tes encouragements. Cela fait maintenant 7 ans que nous nous connaissons, mon destin à croiser ta route lorsque j'étais étudiante en fin d'étude de DUT. Te côtoyer a été une chance inouïe. Je ne te remercierais jamais assez Marie-Françoise et te souhaite tout le meilleur du monde à toi et ta famille !

Cette citation est également en dédicace à Monsieur le Professeur Benoît Foligné. Bien que nous nous connaissions que depuis peu, tu m'as beaucoup aidé dans mon projet de recherche, notamment lors de la soumission de la publication, ton investissement et ton soutien indéniabte dans mes candidatures, tes nombreux conseils dans les présentations pour les congrès, ton engagement auprès de l'école doctorale. Je te souhaite un bel avenir professionnel et personnel et tout plein de belles choses dans ta vie ! Qui sait peut être qu'à l'avenir, j'aurais de nouveau l'opportunité de travailler à tes côtés !

Cette citation, je la dédie également à Zineb BENKOUSSA. J'ai eu une chance inouïe de croiser de nouveau ton chemin lors d'un congrès portant sur l'éthique animale. Je t'exprime ma profonde gratitude et mes remerciements les plus sincères pour ton soutien

infaillible, tes nombreux précieux conseils, ta gentillesse et ta douceur, et pour ton aide infaillible dans ma candidature à l'IUT pour un poste en tant qu'enseignante vacataire obtenu pendant les 2 ans de ma thèse. J'ai ainsi pu revoir et côtoyer les enseignants de l'IUT, notamment Monsieur Emmanuel ROGER, Madame Julie DENOEUDE, Madame Michèle BASTIDE et Madame Marie-Odile RAYMOND. Merci de m'avoir accordé votre confiance et de m'avoir donné cette opportunité de réaliser les enseignements à vos côtés. Merci du temps consacré, de votre encadrement, de votre soutien infaillible, de vos encouragements, de votre aide et disponibilité.

A ma collègue et amie Emilie, je te remercie vraiment pour TOUT, pour ton accueil et ton intégration au sein de l'équipe, cela a été un réel plaisir de te côtoyer au quotidien. Merci de ton soutien infaillible, de ton extrême gentillesse, de ton aide et ton regard critique sur le projet, pour ton aide dans la réalisation des tests statistiques, merci également pour les nombreux conseils pour sublimer les posters. A toi, et à ton fils Robin, je vous souhaite une excellente continuation et un bel avenir.

A mes amies Lidia, Caro et Sarah. Je vous remercie pour votre gentillesse, votre générosité, votre soutien et encouragement et tous les bons moments passés ensemble.

Au Docteur Cécile VIGNAL, merci pour TOUT, pour ton aide, ta disponibilité, ta patience, tes conseils pertinents lors des manipulations, merci de m'avoir formé aux techniques de culture cellulaire et de m'avoir aidé à résoudre les soucis lors des expérimentations. Merci de ton expertise dans ce domaine et pour tous tes précieux conseils ! Merci également pour ton investissement dans ce projet, ton aide précieuse dans la rédaction de l'article. Un très grand merci aussi pour ton avis critique et pertinent lors des réunions qui ont ainsi contribué à l'avancement du projet!

Au Docteur Laurent DUBUQUOY, un grand merci à toi pour tout, merci pour ton soutien, ta disponibilité, tes nombreux précieux conseils pour la publication, pour tes remarques pertinentes lors des réunions et présentations qui ont contribué à l'avancement du projet de recherche.

A la « team » bactériologie pour votre accueil, votre gentillesse, votre aide lors des manipulations, vos enseignements, votre bonne humeur, vos encouragements et soutien.

Durant ces 6 années, j'ai partagé de nombreux moments avec vous, entre rire, joie, naissance, mariage, restaurants, anniversaires. Un très grand merci à vous toutes ! Isabelle, je t'exprime ma profonde reconnaissance et gratitude pour tes enseignements en bactériologie, notamment sur les identifications et la mise en culture des bactéries anaérobies. Merci pour ton aide lors des manipulations, pour tous tes conseils, ta gentillesse. Je te souhaite une bonne continuation et une réussite dans tes projets, également à tes filles Claire et Amandine ! Mes remerciements les plus profonds se tournent également vers Elisabeth (alias Eli), Séverine, Charlotte, Fatiha, Mélissa, Fanny, Angélique, Laetitia, Jennifer, Carole, Elodie, Bérengère, Marie, Jérémie, Fabiola, Susana, Rémy, Séverine LORIDANT, pour votre gentillesse, votre accueil, vos enseignements, votre aide infaillible, votre bonne humeur, et surtout tous les bons souvenirs procurés à vos côtés. Merci pour tout vraiment ! A toi Eli, je t'exprime ma profonde gratitude et mes remerciements les plus sincères pour avoir été constamment à mes côtés, ton extrême gentillesse, ta disponibilité, tes nombreux précieux conseils m'ont beaucoup aidé durant ma thèse et te côtoyer a été un réel plaisir. A Sév, Chacha, Fanny, Angélique, Laetitia, Fatiha, Jennifer, Carole, Mélissa, Bérengère, Marie, Elodie, j'ai été très contente de vous avoir connu, j'ai eu la chance de partager de bons moments et des souvenirs inoubliables à vos côtés. Je vous souhaite un bel avenir à vous toutes ! Egalement un grand merci au Docteur Marie TITECAT pour ton aide lors des manipulations, pour tes enseignements sur les RT-PCR, pour ton soutien et encouragements et pour ta gentillesse. Un grand merci au Docteur Josette BEHRA pour vos encouragements, soutien et votre gentillesse.

A l'ensemble de l'équipe du Professeur SIEPMANN, j'ai eu la chance durant mon cursus de M1 et de M2 de travailler au sein de votre équipe, ces années là resteront une excellente expérience tant sur le plan professionnel que sur le plan relationnel ! Un grand merci au Docteur Nicolas BLANCHEMAIN pour ton aide, tes précieux conseils, ta disponibilité et ta bonne humeur au quotidien ! Egalement un grand merci à toi Mickael. Tu es une personne d'une extrême gentillesse, très serviable, toujours de bonne humeur et plein d'humour. Je te souhaite une belle poursuite et un bel avenir ! J'espère un jour avoir de nouveau l'occasion de retravailler à tes côtés. Egalement un grand merci à l'ensemble des personnes que j'ai côtoyé durant mon M1 et M2 pour votre aide, vos

encouragements, votre gentillesse, votre accueil, votre bonne humeur constante : François, Monique, Feng Chai, Adrien, Marion, Alejandra, les 2 Alice, Moussa, Carla.

A l'ensemble des membres de l'équipe du LIRIC pour votre aide de près ou de loin dans ce projet et vos conseils précieux: Cécile, Caroline DUBUQUOY, Emilie, Léna, Lidia, Caro, Sarah, Aurélien, Cécile LEMOINE, Marie DELBEKE, Arnaud, François, Mohamed, Fatima, Karine, Rogatien, Clovis, Mathilde, Madjid, Christophe, Thaise, Silvia, Adeline, Damien, Solange, Manel, Ségolène, Mélanie. Anne Marie CLABAUT.

A l'ensemble des membres de l'équipe qui ne m'ont cessé de m'encourager et de prendre de mes nouvelles : au Professeur Monsieur SENDID, au Docteur Chantal FRADIN, au Docteur Annie STANDAERT, au Docteur Bertrand MERESSE, au Docteur Benjamin BERTIN, au Docteur Jean-Luc DESSEYN. Egalement un grand merci au Docteur Madame Malika BALDUYCK et au Docteur Madame Laurence GOOSSENS pour vos encouragements, vos enseignements et vos demandes de nouvelles.

Aux responsables administratives Madame Virginie CHAMEROY, Madame Bernadette LEU et Madame Caroline GAVELLE, pour votre excellent travail et votre aide, vos nombreux conseils par rapport notamment aux contrats doctoraux, aux financements, et aux documents administratifs lors des congrès et séminaires, à la diffusion des informations concernant les réunions d'équipe, et les formations.

A l'ensemble de mes amies et amis, pour tous vos conseils, pour votre soutien infaillible et pour tous les bons moments passés à vos côtés, à avoir partagé des événements heureux à vos côtés et espère en partager encore. A Aurélie, Amina, Céline, Espérance, Ulku, Asma, Marie ALBERT, Marie-Agnès, Siham, Sarah, Kahina, Tarek, Ahmed, Clara, Margaux, David, Manel, Michel, Pétra, Virginie, Sirine, Rym, Safaa, Morgane, Tiphaine, Madjda, Lucie, Jhostin, les 2 Moussa, Fadoua, Sirine, Alice.

Aux nombreux étudiants en stage que j'ai côtoyé durant ma thèse et qui ont bien évidemment contribué à l'avancement de ce projet de recherche. Un grand MERCI à Morgane, Tiphaine, Marie-Clémence, Eva, Louise, Marion, Louis, Rosalie, Soumaya, Joséphine, Alan, Manon, Charlotte B, Jane, Typhaine, Perrine, Aurélie, Thibaut, Clément, Tassadit. Merci à vous pour votre aide, votre gentillesse, votre bonne humeur et votre

sérieux, cela a été un réel plaisir de travailler à vos côtés. Un remerciement spécial à toi Morgane pour ton amitié, ta gentillesse, ton humour, ton soutien et tes encouragements.

Aux responsables et représentants de l'Ecole Doctorale, Monsieur le Pr SABLONNIERE, Madame Laurence FOFANA, Monsieur François DELCROIX, Madame Marion BEGUIN et Madame Hélène HERMINET pour votre aide précieuse dans les démarches administratives, votre gentillesse, votre disponibilité et votre patience !!

Je tiens également à exprimer ma gratitude et mes remerciements les plus chaleureux aux infirmières Sabine, Juliette et Jeanne-Louise, Aurélie en charge des prélèvements pour votre aide, votre extrême gentillesse, et votre disponibilité. Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent également à l'ensemble des patients et des sujets sains inclus dans cette étude. Je souhaite à l'ensemble des patients un bon rétablissement et espère que les différents travaux de recherche menés par les différents laboratoires se solderont par la guérison des pathologies inflammatoires intestinales.

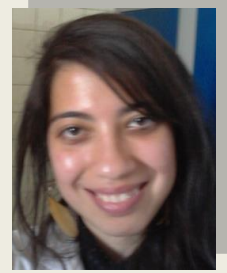
La réalisation de cette thèse a été rendue possible grâce au financement octroyé par la fondation DigestScience. Un très grand merci pour le soutien financier apporté durant mes années de recherche.

Mes remerciements les plus sincères et chaleureuses vont vers ma « famille adoptive » de Vienne, Florian, Maria, Georges et Felizia, famille qui m'a chaleureusement ouverte ses portes lors du congrès UEG. Je vous en serai à jamais reconnaissante pour votre aide, hospitalité, votre gentillesse et sympathie, votre accueil.

Enfin et non pas des moindres, je terminerais par remercier chaleureusement ma famille dont l'affection, l'amour, le soutien et l'encouragement m'ont été d'un grand réconfort et ont contribué à l'aboutissement de ce travail ! Cette thèse je la dédicace tout particulièrement à ma maman et à mon papa. Votre soutien, votre patience et gentillesse, votre amour m'ont beaucoup aidé durant mon cursus professionnel. Merci d'avoir cru en moi ! Mes remerciements les plus sincères vont également à mes frères et sœurs, Malek, Amina, Moussa, Chaïma et Ahmed ! MERCIIII à vous pour tout ! Votre soutien, votre amour, votre aide, votre patience, votre humour, tous les bons moments que j'ai passé à vos côtés resteront des moments inoubliables et gravés dans mon cœur !

CURRICULUM VITAE ET VALORISATION
SCIENTIFIQUE DU TRAVAIL

Oumaïra RAHMOUNI
2 Rue Aristide Briand
59 000 Lille
Tél : 06 09 64 92 15
E-mail: r.ouma599@gmail.com



EXPÉRIENCES PROFESSIONNELLES

De Janvier 2015 à Septembre 2018 :

Doctorante de 3^{ème} année, Laboratoire de Bactériologie Clinique, Faculté de Pharmacie Lille 2 (Lille Inflammation Research International Center (LIRIC) dirigé par le Pr Pierre DESREUMAUX)

Projet de recherche : Portage fécal par le pathovar *Escherichia coli* adhérent et invasif (AIEC) chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et des sujets sains.

Problématique de recherche : Détection, abondance, transmission et réservoir des AIEC chez les patients atteints de MICI vs sujets sains.

De Octobre à Avril 2013 et Octobre à Juin 2014 :

Stages en alternance au Laboratoire de Bactériologie Clinique en collaboration avec le Groupe de Recherche sur les Biomatériaux, Faculté de Pharmacie et de Médecine, Lille 2

Étude de l'effet antibactérien d'un dispositif médical imprégné d'argent dans le traitement des plaies chroniques

- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice du sulfate d'argent sur *E.coli* et *Staphylococcus aureus*
- Fonctionnalisation de textile polyester par du chitosan et imprégnation dans une solution de sulfate d'argent
- Évaluation de l'activité antibactérienne du textile chargé en argent par Kill-Time et test de diffusion
- Étude de la biocompatibilité du textile fonctionnalisé par test de vitalité et prolifération cellulaire

De Novembre à Juin 2012 :

Stage au Laboratoire de Bactériologie Clinique, Lille 2

Étude de la flore intestinale dans la maladie de Crohn

- Comparaison de la flore bactérienne chez des souris saines versus chez des souris enflammées par du DSS
- Étude de l'effet des phages sur le pathovar AIEC
- Identification bactérienne des bactéries aérobies et anaérobies (galerie Api 20E et NE, coloration de Gram, catalase, Maldi-Tof)

Janvier 2012 :

Stage de trois semaines à l'hôpital Claude Huriez dans le secteur endocrinologie et diabétologie au CHRU de Lille

Réalisation de trente prélèvements sanguins veineux chez des patients volontaires

De Avril à Juin 2011 :

Stage de dix semaines au Centre de Biologie Pathologie dans le secteur gestion des risques

Étude et action du charbon actif dans le rejet des effluents d'anatomocytopathologie

FORMATIONS

2015 : École Doctorale Biologie Santé, Université Lille 2

2014 : 2^{ème} année de Master Biologie Santé, Université Lille 2

2013 : 1^{ère} année de Master Conception du Médicament, Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol (ICPAL)

2012 : Diplôme Universitaire Techniques d'Élaboration et Analyse de Biomolécules, ICPAL

2011 : DUT Génie Biologique option Analyses Biologiques et Biochimiques, IUT "A", Université Lille 1

COMPÉTENCES CLÉES

- Domaines de compétences : microbiologie, culture cellulaire, biologie moléculaire, histologie, virologie (phage).
- Gestion d'un protocole de recherche
- Enseignement (TD, TP, projet tutoré)
- Participation à la conception de protocoles
- Encadrement de stagiaires : M1, DEUST, BTS.
- Capacité de réalisation des prélèvements sanguins

INFORMATIONS COMPLÉMENTAIRES

Outils bibliographiques: Pubmed, ScienceDirect

Langues : anglais (courant), espagnol et arabe (niveau scolaire)

Informatique : Word, Excel et Powerpoint, GraphPad Prism

Sports : badminton, renforcement musculaire, cardiologie

Communications internationales et nationales affichées et orales :

Meeting :

- SINAPSIS PARIS 2016 (Paris) (Juillet 2017): Development and evaluation of a wound dressing with antibacterial activity.
- 28^{ème} Conférence annuelle de la société européenne des biomatériaux (ESB) (Athènes) (Septembre 2017): Development of an anti-inflammatory anti-bacterial textile based on a multilayer system to treated infected wounds (Athènes).

Communication affichée :

- 5th World Congress on Targeting Microbiota 2017 (Berlin): Adherent invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease patients.
- UEG Week 2016 (Vienne) (Novembre 2016): Similarities between adherent-invasive *E. coli* strains recovered from Crohn's disease patients and their healthy relatives.
- 17th International Cyclodextrin Symposium (Saarbruecken) (Mai 2014): Multilayer coated textile with extended drug release for wound dressing application.
- Colloque des doctorants, Journée André Verbert Ecole Doctorale Biologie Santé (Lille) (Septembre 2016) : Adherent Invasive *Escherichia coli* in Crohn's disease.

Communication orale :

- Rencontre ingénieur textile (Saint-Etienne) (Octobre 2014) : Conception et évaluation d'un pansement antibactérien.
- Workshop du Pôle de Médecine Régénératrice de Bordeaux (Bordeaux) (Novembre 2014) : Conception et évaluation d'un pansement multicouche antibactérien pour le traitement des plaies chroniques.
- Matériaux 2014 (Montpellier) (Novembre 2014) : Etude, évaluation et conception de textiles fonctionnalisés et chargés en argent dans le traitement des infections de plaies.

Publication :

2018 :

Rahmouni O, Vignal C, Titécat M, Foligné B, Pariente B, Dubuquoy L, Desreumaux P, Neut C.

High carriage of adherent invasive E. coli in wildlife and healthy individuals. Gut Pathogens. 2018 ; 20, 23.

Janvier 2017 :

Galtier M, De Sordi L, Sivignon A, de Vallée A, Maura D, Neut C, Rahmouni O, Wannerberger K, Darfeuille-Michaud A, Desreumaux P, Barnich N, Debarbieux L.

Bacteriophages targeting adherent invasive Escherichia coli strains as a promising new treatment for Crohn's disease. J Crohns Colitis. 2017 ; 11, 840-847.

Novembre 2016 :

Rahmouni O, Dubuquoy L, Desreumaux P, Neut C.

Enteric microflora in inflammatory bowel disease patients. Medecine Science. 2016 ; 32, SI, 968-973.



DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A WOUND DRESSING WITH A DUAL ANTIBACTERIAL / ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY.

Alejandra Mogrovejo-Valdivia^{a,b}, Oumaira Rahmouni^{a,c}, François Aubert-Viard^{b,d}, Nicolas Tabary^{a,d}, Mickael Maton^{a,b}, Christel Neut^{a,c}, and Bernard Martel^{a,d}, Nicolas Blanchemain^{a,b}

^a Université de Lille, 59000 Lille, France

^b INSERM U1008, Controlled Drug Delivery Systems and Biomaterials, 59000 Lille, France

^c INSERM U995, Laboratoire de Bactériologie clinique, Université Lille 2, 59006 Lille, France

^d UMET, Ingénierie des Systèmes Polymères, Université de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

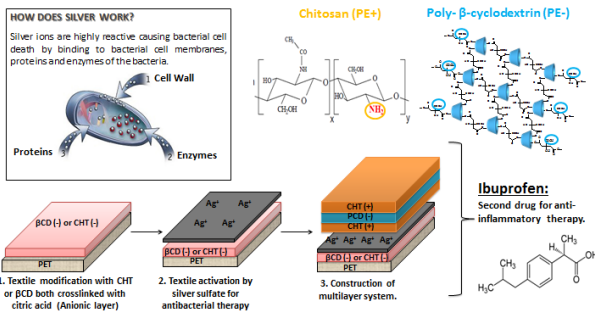
INTRODUCTION

Wound healing represents a public health problem with an increase in susceptible populations like geriatric or diabetic patients. The major complication is infection, associated to an increase of morbidity (amputation) or mortality (sepsis). Several silver-based wound dressings are marketed for treating infection. Nevertheless, a large amount of silver diffuse in the wound and complicate the healing process. Our strategy is to i) Create a barrier effect which limits the diffusion of silver in the wound; ii) Ensure the hydration of the wound for better healing; iii) Charge the multilayer system with ibuprofen to provide additional anti-inflammatory therapy.

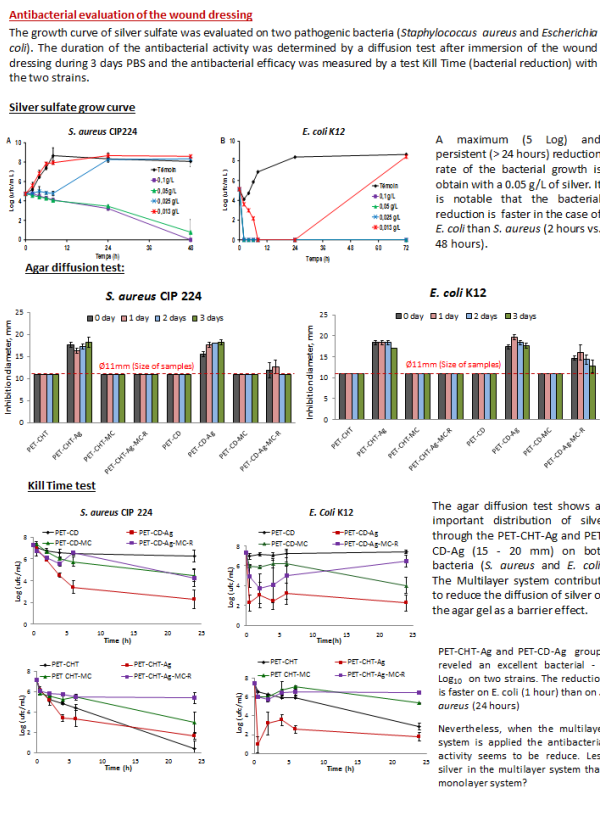
GOAL OF THE WORK

A silver wound dressing with a Multilayer Polyelectrolyte System as a barrier effect and drug delivery properties

First, the non woven polyester (PET) is functionalized by chitosan or β -cyclodextrin both crosslinked with citric acid in order to obtain an anionic layer (PET-CHT, PET- β CD). Then, the textile is loaded with silver ion by ionic interaction to obtain a second antibacterial layer. Finally to avoid the diffusion of silver into the wound and obtain a dual therapeutic activity, a multi-layer system based on successive layer of chitosan as positive polyelectrolyte (PE+) and Poly- β -cyclodextrin as negative polyelectrolyte (PE-) (PET-CHT-Ag-MC, PET- β CD-Ag-MC).



RESULTS (Microbiological evaluation)



Adherent Invasive *Escherichia coli* in Crohn's disease patients.

Authors: Oumaira Rahmouni¹, Cécile Vignat², Benjamin Pariente², Pierre Desreumaux^{2,3}, Christel Neut¹

Institution 1: University of Lille, College of Pharmacy, 3 Rue du Prof. Laguerre, 59008 Lille, France; 2: INSERM U1025, F-59045 Lille, France; 3: CHU Lille, Service des Maladies de l'Appareil Digestif et de la Nutrition, Hôpital Claude Huriez, F-59037 Lille, France

Introduction

Crohn's disease (CD) is an inflammatory bowel disease (IBD) that may affect any part of the gastrointestinal tract from mouth to anus. Etiology of CD remains unknown. Various alterations of the gut microbiota have been reported. An imbalance between "protective" bacteria and "pathogenic bacteria", termed dysbiosis, could play a role in the aggravation of the disease. Other studies have focused on a potential new pathovar named Adherent Invasive *Escherichia coli* (AIEC) which could affect specifically a group of CD patients. These pathovars, unlike commensal *E. coli*, have the properties to adhere to and to invade the intestinal epithelial cells and to survive in macrophages (Figure 1). However, many major questions remain unresolved concerning AIEC and CD:

- Prevalence of AIEC in CD ?
- Proportion of AIEC among *E. coli* family in these patients ?
- Specificity of AIEC to CD patients ?

Figure 1- Transmission electron micrograph of AIEC within macrophages.



Aims

- 1) To evaluate the AIEC prevalence in CD patients in order to determine the possible involvement of this pathovar in IBD patients.
- 2) To assess the proportion of AIEC among *E. coli* family in feces of CD patients.
- 3) To study the specificity of AIEC to CD patients.

Methods

Experiment 1: Quantitative composition of the microflora in 58 CD fecal sample.

IBD stools are recovered from Gastroenterology department. A total of 58 fecal samples from CD patients were analysed by microbiological procedures. Quantitative composition of the microflora were analysed. Proportion of *E. coli* among the total cultivable flora was evaluated by culture on selective MacConkey medium and blood agar medium (Figure 2). The results are expressed in log CFU/g.

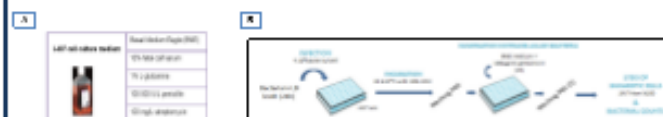
Figure 2- Identification methods of *Escherichia coli* strains from a fecal CD sample.



Experiment 2: Adhesion and invasion properties of *E. coli* isolated from CD patient feces.

E. coli isolated from each CD patients were tested *in vitro* in order to determine the capacity of these strains to adhere to and to invade the intestinal cells using I-407 (Figure 3).

Figure 3- A. Composition of the I-407 cell culture medium. B. Cell culture method to identify an AIEC strain (cell analysis in I-407 cells)



Experiment 3: Specificity of AIEC to CD patients.

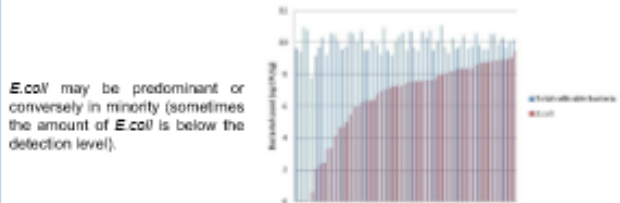
In order to evaluate the specificity of AIEC to CD patients, the prevalence of AIEC has been studied in CD patients and compared to 83 feces sample from ulcerative colitis (UC) patients.

Conclusion and prospects

Gut flora of IBD patients is characterized by a dysbiosis. The AIEC prevalence in 58 CD patients was about 23%. The AIEC prevalence study in IBD patients is one of the largest cohort studies in the world. In CD patients, AIEC represent a large proportion of *E. coli* family. These pathovars are also found in 13% of UC patients suggesting that AIEC are not specific to CD. The AIEC duration over time remains unknown and will be studied in IBD patients.

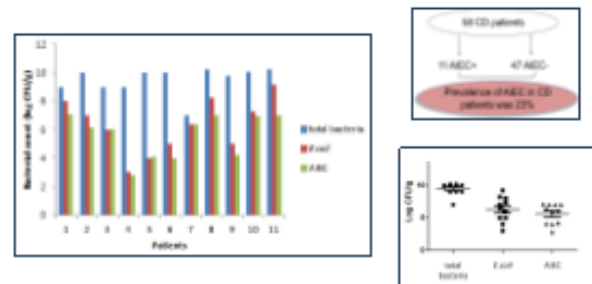
Results

- Quantitative microflora analysis in CD patients.



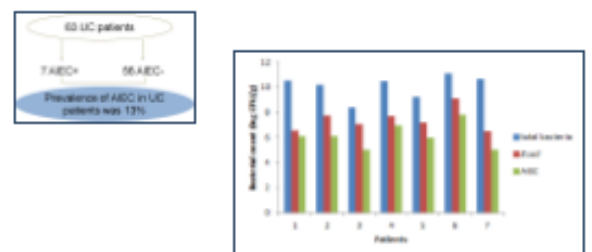
The quantification of *E. coli* among the total cultivable bacteria is variable from one patient to another.

- AIEC prevalence and quantification in CD patients.



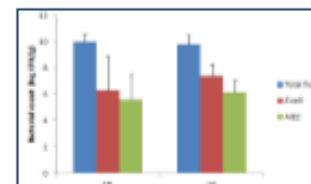
AIEC is predominant among the *E. coli* family in CD patients colonized by AIEC.

- AIEC prevalence in UC patients.



AIEC is not specific to CD. This pathovar is also found in UC patients and is predominant among *E. coli* family.

- Comparison of mean AIEC prevalence in CD and UC patients.



The mean AIEC quantification in feces sample is 5,6 and 6,1 log CFU/g in CD and UC respectively.

Adherent Invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease patients.

Authors: Oumaira Rahmouni^{1,2}, Cécile Vignal², Benjamin Pariente^{2,3}, Pierre Desreumaux^{2,3}, Christel Neut^{1,2}

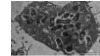
Institution : 1: University of Lille, College of Pharmacy, 3 Rue du Prof. Laguesse, 59006 Lille, France; 2: INSERM LIRIC U995, F-59045 Lille, France; 3: CHU Lille, Service des Maladies de l'Appareil Digestif et de la Nutrition, Hôpital Claude Huriez, F-59037 Lille, France

INTRODUCTION

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis, referred as inflammatory bowel diseases (IBD), are multifactorial diseases in which genetic, environmental and immune factors act in concert to initiate the inflammation of the intestinal mucosa. In IBD patients. Various alterations of the gut microbiota have been reported. An imbalance between "protective" bacteria and "potentially pathogenic bacteria", termed dysbiosis, plays a role in the aggravation of the disease. Many studies have focused on a specific pathovar named Adherent Invasive *Escherichia coli* (AIEC). This pathovar, unlike commensal *E.coli*, is virulent because of its ability to adhere to and to invade the intestinal cells and to survive in macrophages (Figure 1). However, many major questions remain unresolved concerning AIEC and CD:

- What is the prevalence of AIEC in CD patients?
- What is the proportion of AIEC among the entire *E. coli* population in these patients?
- Is AIEC specific to CD or also encountered in other IBD patients ?

Figure 1- Transmission electron micrograph of AIEC within macrophages.



AIMS

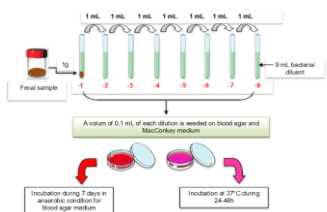
To assess: 1) the qualitative and quantitative composition of microbiota in fecal samples of CD patients, 2) the AIEC prevalence in CD patients in order to determine the possible involvement of this pathovar in disease, 3) to study AIEC colonization in other IBD patients.

METHODS

Experiment 1: Quantitative composition of enterobacteria from 116 fecal sample in IBD patients.

IBD stools are recovered from Gastroenterology department. A total of 116 fecal sample from CD (n=58) and UC patients (n=58) were analysed by microbiological procedures. Quantitative composition of the microflora is analysed by using two bacterial media in order to evaluate the proportion of *E.coli* among the total cultivable bacteria by MacConkey medium and blood agar medium respectively (Figure 2). The results are expressed in log CFU/g.

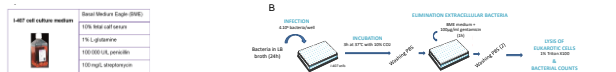
Figure 2- Identification methods of *Escherichia coli* strain from a fecal CD sample.



Experiment 2: Adhesiveness and invasiveness of *E.coli* isolated from IBD patients' feces.

10 *E.coli* isolates from each CD patients are then tested by cellular culture in order to determine the capacity of these strains to invade the intestinal cells I-407 and to determine the prevalence of AIEC (Figure 3).

Figure 3- A. Composition of the I-407 cell culture medium. B. Cell culture method standard to identify an AIEC strain (cell analysis in I-407 cells).



Experiment 3: Persistence of AIEC colonization in CD patients.

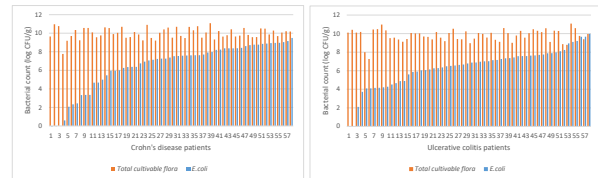
The microflora composition (total cultivable bacteria, *E.coli* and AIEC) overtime has been studied by fecal samples analysis from a same CD patient at different times.

CONCLUSION AND PROSPECT

Gut flora of IBD patients is characterized by a dysbiosis. The AIEC prevalence is about 17% and 5% in CD and UC patients respectively. This AIEC prevalence study in IBD patients is one of the largest cohort studies in the world. In IBD patients, when present, AIEC represent a large proportion of *E.coli* population. The AIEC persistence remains unknown and needs to be studied in a large series of IBD patients.

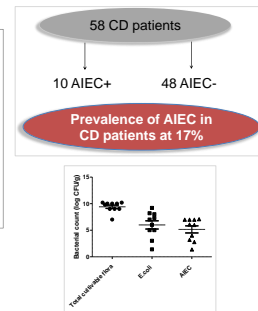
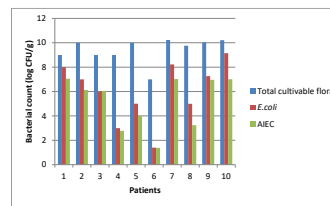
RESULTS

Quantitative microflora analysis in IBD patients:



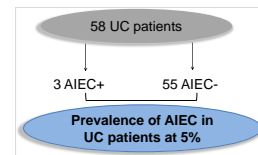
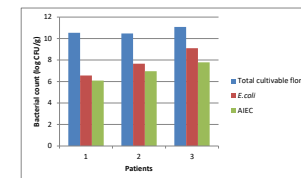
E.coli may be predominant or conversely in minority (sometimes the amount of *E.coli* is below the detection level). The quantification of *E.coli* among the total cultivable bacteria is variable from one patient to another.

AIEC prevalence and quantification in CD patients:



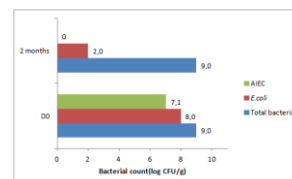
AIEC is predominant among the *E.coli* population in CD patients.

AIEC prevalence and quantification in UC patients:



AIEC is not specific to CD. This pathovar is also found in UC patients and is predominant among the *E.coli* population.

Bacterial colonization overtime in one CD patient:



Clinical data	Man 34 years old Ileal CD
Day 0: acute disease 2 months later: quiescent disease	

AIEC may be linked to the activity of the CD.

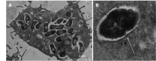
Similarities between adherent-invasive *E.coli* strains recovered from Crohn's disease patients and their healthy relatives.

Authors: O. Rahmouni¹, A. Sivignon², C. Vignal¹, C. Gower-Rousseau¹, C. Flahaut³, J.L. Desseyn¹, N. Barnich², J.F. Colombel⁴, B. Pot⁵, P. Desreumaux¹, C. Neut¹

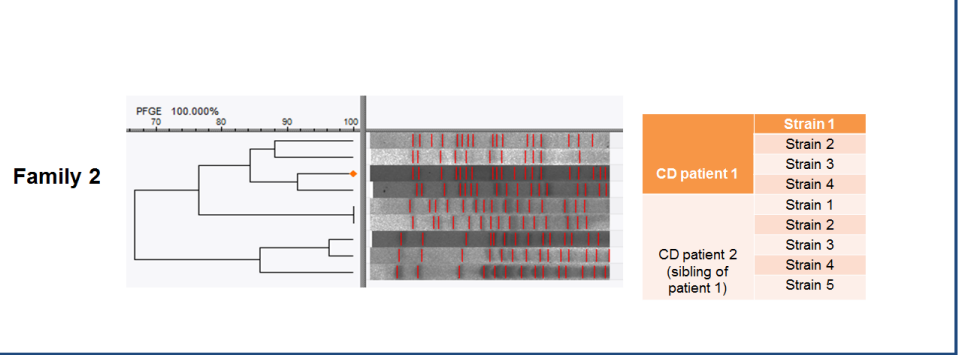
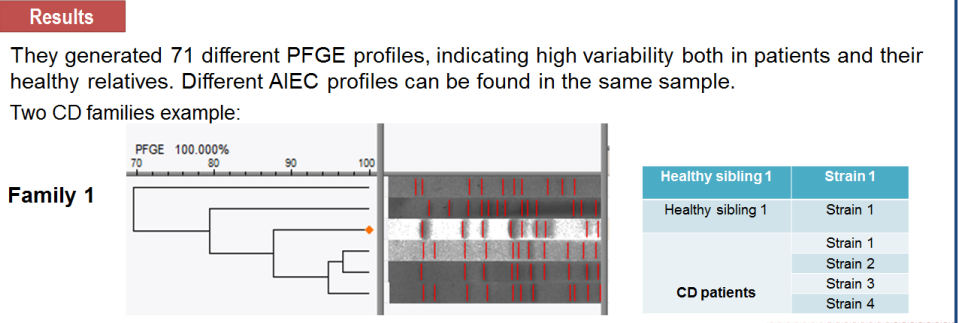
Institution : ¹ Lille Inflammation Research International Center UMR 995 Inserm, Lille University, CHRU Lille, France, ² Clermont Université, M2ISH, UMR 1071 INSERM/Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, Unité Sous Contrat 2018 Institut National de la Recherche Agronomique, Clermont-Ferrand, France, ³ Institut Charles Violette, Université d'Artois, Lens, France, ⁴ ICAHN School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA, ⁵ Institut Pasteur de Lille, U 1019, UMR 8204, CIL, Lille University, CNRS, INSERM, CHU Lille, France

Introduction Inflammatory bowel disease (IBD), including Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), are a chronic complex relapsing diseases whose etiology is still uncertain. A genetic predisposition to IBD has been long suspected, given the existence of ethnic and familial aggregations of these diseases. Intrafamilial cases of CD have shown that relatives of an IBD patient have a much higher risk (10 fold increased risk) to develop the same disease than the general population. Familial IBD may be linked to genetic susceptibility and/or transmissible agents. Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) has been consistently implicated as a pro-inflammatory species in CD.

Figure 1- Transmission electron micrograph of adherent, invasive Escherichia coli within macrophages.



Aims To investigate similarities between different *E. coli* strains from CD cases and their healthy relatives issued from a French population-based IBD registry.



Conclusions The AIEC population is rather heterogeneous and one person can harbor up to three different profiles for AIEC strains. On the whole profiles are different in healthy persons and CD patients belonging to the same family. These observations are in agreement with a low risk of intrafamilial transmission.

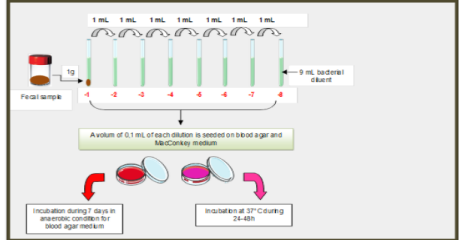
Methods **Population**

A case-control study, based on the AIEC reservoir from fecal sample in the first-degree relatives of CD patients from the Gastroenterology department, includes 17 familial CD cases. A total of 82 AIEC strains from 38 individuals (19 CD patients and 19 healthy relatives) belonging to 17 families with at least one case of CD are investigated

Quantification of *E.coli* strains

Stools, recovered from Gastroenterology department in 17 CD families, were analyzed by microbiological procedures (Figure 2). Composition of the total cultivable bacteria and *E.coli* strains were quantified by blood agar and selective MacConkey medium respectively. A total of 246 strains were isolated from 38 individuals belonging to 17 families with at least one case of CD.

Figure 2- Identification methods of Escherichia coli strain from a fecal CD sample



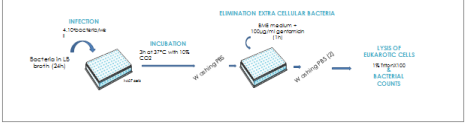
Recovery of strains

E.coli isolates were stored in an enrichment broth. Invasion test will be performed in order to determine if the *E.coli* isolates are able to invade to the intestinal epithelial cells.

Invasion tests

The invasiveness properties of *E.coli* isolates were checked by infecting Intestine-407 (ATCC CCL-6) epithelial cells during three hours by the *E.coli* strains at a multiplicity of infection of 10 bacteria per cell (Figure 3).

Figure 3- Cell culture method standard to identify an AIEC strain (cell analysis in I-407 cells).



PFGE

AIEC strains were further typed by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) using *XbaI* as restriction enzyme.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
CURRICULUM VITAE ET VALORISATION SCIENTIFIQUE DU TRAVAIL	9
TABLE DES MATIERES.....	16
ABREVIATIONS	22
TABLE DES FIGURES	25
LISTE DES TABLEAUX.....	28
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	30
CHAPITRE 1 : ASPECTS CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES DES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN.....	31
I. Généralités	31
II. Epidémiologie des MICI.....	31
1. Une pathologie affectant des personnes de tout âge:	31
2. Et qui se mondialise :	31
III. Expression clinique des MICI.....	34
1. Symptomatologie :.....	34
2. Complications :.....	34
IV. Diagnostic des MICI.....	35
1. Examens biologiques :	35
2. Examens endoscopiques et histologiques :	36
2.1 Dans le cas de la MC :	36
2.2 Dans le cas de la RCH :	37
V. Stratégies thérapeutiques.....	38
1. Dans la maladie de Crohn:.....	38

2.	Dans la rectocolite hémorragique:.....	38
3.	Traitement chirurgical:.....	38
CHAPITRE 2 : ETIOLOGIE DES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN.		40
I-	Facteurs génétiques :	41
1.	Gène NOD2 :	42
2.	Gène ATG16L1 :	43
3.	Gènes IRGM et MDR1 :	44
II-	Anomalies du système immunitaire :	44
III-	Facteurs environnementaux :	45
1.	Tabagisme :	45
2.	Antibiothérapie :	46
3.	Alimentation :	46
4.	Allaitement maternel :	47
5.	Hypothèse de l'hygiène :	47
6.	Espèces réactives de l'oxygène :	48
7.	Troubles de l'humeur et facteurs psychosociaux :	48
IV-	Rôle de la microflore bactérienne:	50
1.	Généralités :	50
2.	Mise en place du microbiote intestinal :	50
3.	Stabilité :	50
4.	Fonctions du microbiote intestinal :	51
4.1	Métabolisme des nutriments.....	51
4.2	Protection de l'hôte et développement du système immunitaire	52
5.	Composition du microbiote intestinal :	53

6.	Maintien de l'homéostasie intestinale par les mécanismes immunitaires :....	55
7.	Dysbiose :	58
CHAPITRE 3 : LE PATHOVAR <i>E. coli</i> ADHERENT ET INVASIF (AIEC) ET SON IMPLICATION DANS LES MICI ?		61
I.	<i>E. coli</i> et MICI :	61
1.	Etude de la proportion des <i>E. coli</i> dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MICI:	61
2.	Recherche de corrélation entre l'activité de la MICI et la quantité des <i>E. coli</i> :.61	
3.	Caractéristiques pathogéniques des souches <i>E. coli</i> de patients atteints de MICI :.....	62
II.	Définition de l'AIEC :	63
III.	Mécanismes utilisés par le pathovar AIEC dans le contexte inflammatoire :	63
1.	Différents mécanismes utilisés par le pathovar AIEC dans le contexte des MICI :.....	63
2.	Facteurs de virulence du pathovar AIEC :.....	65
2.1	Les flagelles.....	65
2.2	Les fimbriae	66
2.3	Le LPS.....	66
2.4	Les protéines autotransporteuses.....	67
2.5	Autres facteurs de virulence	67
IV.	Méthodologie d'identification de l'AIEC :.....	67
V.	Prévalence des AIEC dans les MICI vs sujets sains :.....	69
5.1	Prévalence des AIEC chez les patients atteints de la MC :	70
5.2	Prévalence des AIEC chez les patients atteints de RCH :.....	70
5.3	Prévalence des AIEC chez des sujets sains :.....	71
VI.	Questionnement sur les AIEC:.....	71

6.1 Rôle primaire ou secondaire des AIEC dans les MICI :.....	71
6.2 Persistance des AIEC dans les MICI et sujets sains :	72
6.3 Réservoir et habitat des AIEC :	72
OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE	73
PARTIES EXPERIMENTALES.....	77
Recherche des AIEC dans les matières fécales des patients atteints de MICI versus témoins sains.....	78
1. Présentation de l'étude :.....	78
2. Modèle expérimental d'étude :	78
3. Matériel expérimental:.....	78
4. Méthodologie:.....	79
4.1 Méthode d'isolement des bactéries et dénombrement « quantitatif » à partir des prélèvements de matière fécale des patients atteints de MICI et des sujets sains :	79
4.2 Méthode d'identification et dénombrement « qualitatif » de la flore entérobactérienne dont les <i>E. coli</i> à partir des géloses MacConkey :.....	81
4.3 Identification phénotypique du pathovar AIEC à partir des souches <i>E. coli</i> isolées des matières fécales de patients et de témoins:	82
4.3.1 Test de culture cellulaire selon la méthode de référence d'identification des souches invasives :.....	82
4.3.2 Test de sensibilité à la gentamicine :	85
4.3.3 Etude des gènes de virulence associés aux pathotypes entéropathogènes :	85
4.3.4 Test de survie et de répllication des souches invasives à l'intérieur des macrophages murins J774-A1:.....	88
4.4 Typage bactérien pour l'étude de la diversité des pathovars AIEC :.....	88

4.5 Détermination de la phylogénétique des souches AIEC chez les patients atteints de MICI vs témoins sains:	89
5. Résultats :	90
5.1 Quantification d' <i>E. coli</i> dans les matières fécales.....	90
5.2 Taux et fréquence d'isolement des AIEC dans les différents groupes.....	93
5.2.1 Capacité d'invasion des souches <i>E. coli</i> :	93
5.2.2 Recherche des gènes de virulence sur les souches <i>E. coli</i> invasives :.....	94
5.2.3 Etude de la capacité des souches à survivre et à se répliquer en macrophages :.....	94
5.2.4 Prévalence des AIEC dans les différents groupes :	97
5.2.5 Taux moyen des AIEC dans les 3 groupes :	98
5.2.6 Proportion des AIEC parmi les <i>E. coli</i> :	99
5.2.7 Etude de la détection des AIEC dans les 3 groupes:	100
5.2.8 Etude des scores d'invasion des souches AIEC dans les différents groupes :.....	104
5.2.9 Etude du degré de similitude du pathovar AIEC :.....	105
5.2.10 Détermination des groupes phylogénétiques du pathovar AIEC chez les différents groupes :.....	107
Recherche des AIEC parmi les souches <i>E. coli</i> d'origine intestinale des individus et animaux sains issus de la collection ECOR.....	108
Test de sensibilité à la gentamicine:	110
Evaluation de la capacité d'invasion des souches de la collection sur la lignée cellulaire I-407:.....	110
Recherche des principaux gènes de virulence associés aux <i>E. coli</i> entéropathogènes sur les souches invasives et cytotoxiques de la collection:.....	113
Capacité d'adhésion et de survie et de réplication des souches invasives de la collection ECOR.....	115

6. Hypothèse scientifique :	117
DISCUSSION :	119
CONCLUSION ET PERSPECTIVES :	143
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :	147

ABREVIATIONS

AAF	Aérobies anaérobies facultatives
Ac	Anticorps
AIEC	Adherent invasive <i>Escherichia coli</i>
5-ASA	Acide 5-aminosalicylique
AMPs	Peptides antimicrobiens
ASCA	Anticorps anti- <i>Saccharomyces cerevisiæ</i>
ATB	Antibiotique
ATG16L1	Autophagy-related 16-like 1 gene
BH	Bouillon coeur cervelle
BME	Basal medium eagle
CARD15	Caspase recruitment domain-containing protein 15
CD	Cellule dendritique
CEACAM6	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6
CHI3L1	Chitinase 3 – like – 1
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CRP	Protéine C reactive
CS	Columbia au sang
DAEC	Diffuse-adhering <i>E. coli</i>
DEC	Diarrheagenic <i>E. coli</i>
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
EAEC	Enteroaggregative <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECOR	<i>E. coli</i> standard collection of reference
EHEC	Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogenic <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxigenic <i>E. coli</i>

ExPEC	Extra-intestinal pathogenic <i>E. coli</i>
FISH	Hybridation fluorescente in situ
HLA	Human leukocyte antigen B27
Hly	Hémolysine
H ₂ S	Sulfure d'hydrogène
IEL	Lymphocytes intra-épithéliaux
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobine
IRGM	Immunity-related guanosine triphosphatase
LB	Luria Bertani
LPF	Long polar fimbriae
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> sous-espèce <i>paratuberculosis</i>
MC	Maladie de Crohn
MDP	Muramyldipeptide
MDR	Multidrug resistance
MHA	Mueller Hinton agar
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MSLT	Multilocus Sequence Typing
MUC2	Mucine
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
pANCA	Perinuclear antineutrophil cytoplasmic
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulse-field gel electrophoresis
RC	Ringer cystéiné
RCH	Rectocolite hémorragique
SCFA	Short chain fatty acids

SVF	Sérum de vœu fœtal
TJ	Jonctions serrées
TLR	Récepteurs Toll-like
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRIF	TIR-containing adaptator inducing interferon- β
UFC	Unité formant colonie
VL	Viande Levure
WWa	Wilkins West agar
WWI	Wilkins West liquide

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Taux d'incidence et/ou prévalence de la MC dans le monde entier (A) avant 1960, (B) de 1960 à 1979 et (C) après 1980. Les valeurs d'incidence et de prévalence ont été classées en quintiles représentant une faible occurrence à la maladie (bleu foncé et bleu pâle) à une occurrence intermédiaire (verte) à élevée (jaune et rouge) ¹⁷	33
Figure 2: Principales manifestations extra-intestinales des MICI: A/ uvéite à hypopion et b/ érythème noueux ^{22,23}	35
Figure 3: Observation par microscopie électronique d'une coupe de côlon chez un patient atteint de la MC: infiltration massive de lymphocytes T helper de type I et formation de granulome (Objectif 10). Photographie issue des lames histologiques de l'IUT « A » de l'Université de Lille 1.....	36
Figure 4: Observation par microscopie électronique a. d'un abcès cryptique (Objectif 40) et b. d'un pseudopolype (Objectif 10) au niveau du côlon d'un patient atteint de la RCH. Photographies issues des lames histologiques de l'IUT « A » de l'Université de Lille 1.....	37
Figure 5 : Les MICI sont des pathologies complexes pour lesquelles les facteurs environnementaux, la génétique et la microflore intestinale entraîneraient une suractivation du système immunitaire et conduiraient à une inflammation chronique de l'intestin ⁴⁶	41
Figure 6 : Structure du gène et de la protéine NOD2/CARD15 ⁴⁹	42
Figure 7 : Altérations de la production des α - défensines par les cellules de Paneth en cas de mutations du gène <i>NOD2</i> chez les patients atteints de la MC ⁵¹	43
Figure 8 : Hypothèses des mécanismes physiopathologiques des MICI ⁵³	45
Figure 9 : Les déterminants génétiques, environnementaux et microbiens associés aux MICI ^{59,47}	49
Figure 10 : Fonctions du microbiote intestinal ⁷³	53
Figure 11 : Répartition des communautés microbiennes et des gradients physiologiques le long du tractus gastro-intestinal de l'hôte humain ⁶⁶	54

Figure 12 : Mécanismes immunitaires et microbiote intestinal contribuent au maintien d'une homéostasie intestinale ⁷⁵	56
Figure 13: Représentation schématique de la dysbiose intestinale ⁴⁵	60
Figure 14 : Stratégies utilisées par l'AIEC pour exacerber l'inflammation intestinale ⁹⁹ ..	64
Figure 15 : Microscopie électronique à transmission montrant l'internalisation des AIEC dans les macrophages. A : le pathovar AIEC HM605, isolé au niveau de la muqueuse colique chez un patient atteint de la MC, survit et se réplique dans les vésicules des macrophages murins J774-A1; B: membrane double autour de la vésicule intra-macrophage indiquant que les bactéries sont contenues dans les phagolysosomes ⁶² .	68
Figure 16 : Exemple d'un résultat qualitatif permettant de sélectionner les souches invasives utilisées dans le test quantitatif.	83
Figure 17 : Recherche et détection de gènes.....	86
Figure 18 : Détermination du groupe phylogénétique par PCR en temps réel ¹¹⁶	89
Figure 19 : Quantification de la flore <i>E. coli</i> (exprimée en log UFC/g) chez les différents groupes de patients versus témoins sains.....	90
Figure 20 : Variations de la flore <i>E. coli</i> dans les 3 groupes.....	92
Figure 21 : Prévalence des AIEC chez les différents groupes.....	98
Figure 22 : Quantification des AIEC chez les patients atteints de MICI en comparaison aux individus sains.	99
Figure 23 : Etude de la proportion des souches AIEC par rapport à la flore <i>E. coli</i> dans les différents groupes de populations.....	100
Figure 24 : Score d'invasion des souches AIEC dans les différents groupes.....	104
Figure 25 : Dendrogramme établi pour 82 souches AIEC des patients atteints de la MC et des individus sains.	106
Figure 26 : Score d'invasion des souches <i>E. coli</i> de la collection ECOR.	112
Figure 27: Hypothèse du rôle des AIEC dans les MICI, AIEC considérés comme des pathobionts.....	118
Figure 28 : Rôle de différentes molécules inflammatoires impliquées dans la physiopathologie de la MC ¹²³	121
Figure 29: Profil spectrométrique du pathovar AIEC LF82 : expression de deux protéines spécifiques HdeA en position 9712,727 et HdeB en position 9067,776.	131

Figure 30 : Evaluation de l'effet de l'acidité sur la croissance de la souche commensale *E. coli* K12 et des souches AIEC dont la souche de référence LF82 (pH compris entre 3 et 7). 133

Figure 31 : Comparaison de la CMI de différents ATB des souches AIEC avec une souche commensale non invasive. 137

Figure 32 : Comparaison du % d'invasion des 53 AIEC isolés chez les patients atteints de la MC en fonction de leur sensibilité ou résistance aux différents ATB. 139

Figure 33 : Comparaison du % d'invasion des 31 AIEC isolés chez les patients atteints de la MC en fonction de leur capacité à former un biofilm. 141

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: Incidence et prévalence des MICI dans différentes zones géographiques ^{7,8,9,10,11}	32
TABLEAU 2 : Principaux gènes de virulence associés aux souches AIEC isolées de patients atteints de la MC ¹⁰⁰	65
TABLEAU 3 : Caractéristiques des 12 souches AIEC isolées de patients MC ¹⁰⁵	70
TABLEAU 4 : Primers utilisés pour la détection des gènes de virulence des souches <i>E. coli</i> entéropathogènes.	87
TABLEAU 5 : Primers utilisés pour la détermination phylogénétique des souches AIEC ^{115,116}	89
TABLEAU 6 : Etude de l'invasion des souches <i>E. coli</i> dans les 3 groupes.	93
TABLEAU 7 : Résumé de l'isolement des souches AIEC dans les 3 groupes.....	101
TABLEAU 8 : Caractéristiques des souches <i>E. coli</i> d'origine intestinale isolées d'individus et d'animaux sains issus de la collection ECOR ^{120,98}	109
TABLEAU 9 : Résumé des caractéristiques des souches invasives et des souches capables de détacher les cellules I-407.....	114
TABLEAU 10 : Capacité d'adhésion sur les cellules I-407 et de survie et de réplication à l'intérieur des macrophages J774-A1 parmi les 15 souches invasives de la collection ECOR.	116
TABLEAU 11 : Déterminants génétiques de virulence des souches AIEC et des cellules capables de décrocher les cellules I-407 parmi la collection ECOR.....	127
TABLEAU 12 : Facteurs de virulence de la souche AIEC NRG857c ¹³⁹	130
TABLEAU 13: Caractéristiques des souches investiguées dans cette étude	135
TABLEAU 14 : Caractéristiques des souches investiguées dans cette étude :	140

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : ASPECTS CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES DES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN.

I. Généralités

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) constituent un des problèmes majeurs de la gastroentérologie du 21^{ème} siècle. Elles touchent aujourd'hui près de 2,5 millions de personnes dans le monde^{1,2}. Les MICI se définissent par une inflammation chronique de l'intestin grêle ou du gros intestin. Cette inflammation non contrôlée par le système immunitaire va altérer une partie de l'intestin. Elles se caractérisent par des lésions inflammatoires pouvant atteindre l'ensemble du tractus gastro-intestinal, conséquence d'une réponse immunitaire intestinale inadaptée à l'encontre des bactéries habituelles de la flore intestinale². Bien que la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) fassent partie d'un même groupe de maladies, leur expression clinique et leur évolution sont différentes. La MC est une affection intestinale pouvant affecter l'ensemble du tractus gastro-intestinal, de la bouche à l'anus, elle se caractérise par une inflammation discontinue de la paroi de l'intestin (alternance de tissus sains et malades)^{3,4}. Dans le cas de la RCH, les atteintes inflammatoires sont continues et sont généralement limitées au côlon et rectum³.

II. Epidémiologie des MICI

1. Une pathologie affectant des personnes de tout âge:

Les MICI touchent principalement les sujets jeunes. Longtemps considérée comme une maladie se déclarant uniquement chez les jeunes individus, 10 à 30% des patients développent néanmoins une MICI à l'âge de plus de 60 ans⁵.

2. Et qui se mondialise :

Durant ces dernières années, l'incidence (nombre de nouveaux cas par an/10⁵ habitants) et la prévalence (nombre total de cas/10⁵ habitants à une période donnée) des

MICI ne cessent d'augmenter dans le monde entier. L'incidence des MICI dépend des zones géographiques. De fortes incidences de ces pathologies digestives ont été reportées en Europe du Nord et en Amérique du Nord, essentiellement dans les pays développés tels que le Canada, l'Islande, le Royaume-Uni et l'Australie. Similairement, la prévalence des MICI reste très élevée en Europe et au Canada⁶ (Tableau 1). En France, approximativement 200 000 personnes seraient touchées par ces maladies chroniques⁷, avec notamment une plus forte prévalence de cas de MC dans le Nord⁸.

TABLEAU 1: Incidence et prévalence des MICI dans différentes zones géographiques^{9,10,11,12,13}.

Incidence des MICI (/10 ⁵ habitants/an)	MC	RCH	Période d'étude
Canada	20.2	19.2	1998-2000
Islande	24.3	/	/
Royaume-Uni	10.6	/	1991-1992
Australie	29.3	17.4	2007-2008
Prévalence des MICI (/10 ⁵ habitants)	MC	RCH	Période d'étude
Italie	322	/	/
Norvège	262	505	1990-1994
Canada	319	248	1998-2000

Les MICI, traditionnellement limitées aux pays occidentaux industrialisés (Amérique du Nord et Europe de l'Ouest), deviennent des pathologies communes à de nombreux pays ayant adopté le style de vie occidental¹⁴ (Figure 1). Les MICI commencent ainsi à toucher aussi bien les pays développés que les pays en voie de développement¹⁵. Durant ces trois dernières décennies, les populations d'Asie et d'Europe de l'Est, qui étaient considérées jusque-là comme à faible risque, sont témoins d'une augmentation substantielle de cas de MICI¹⁶.

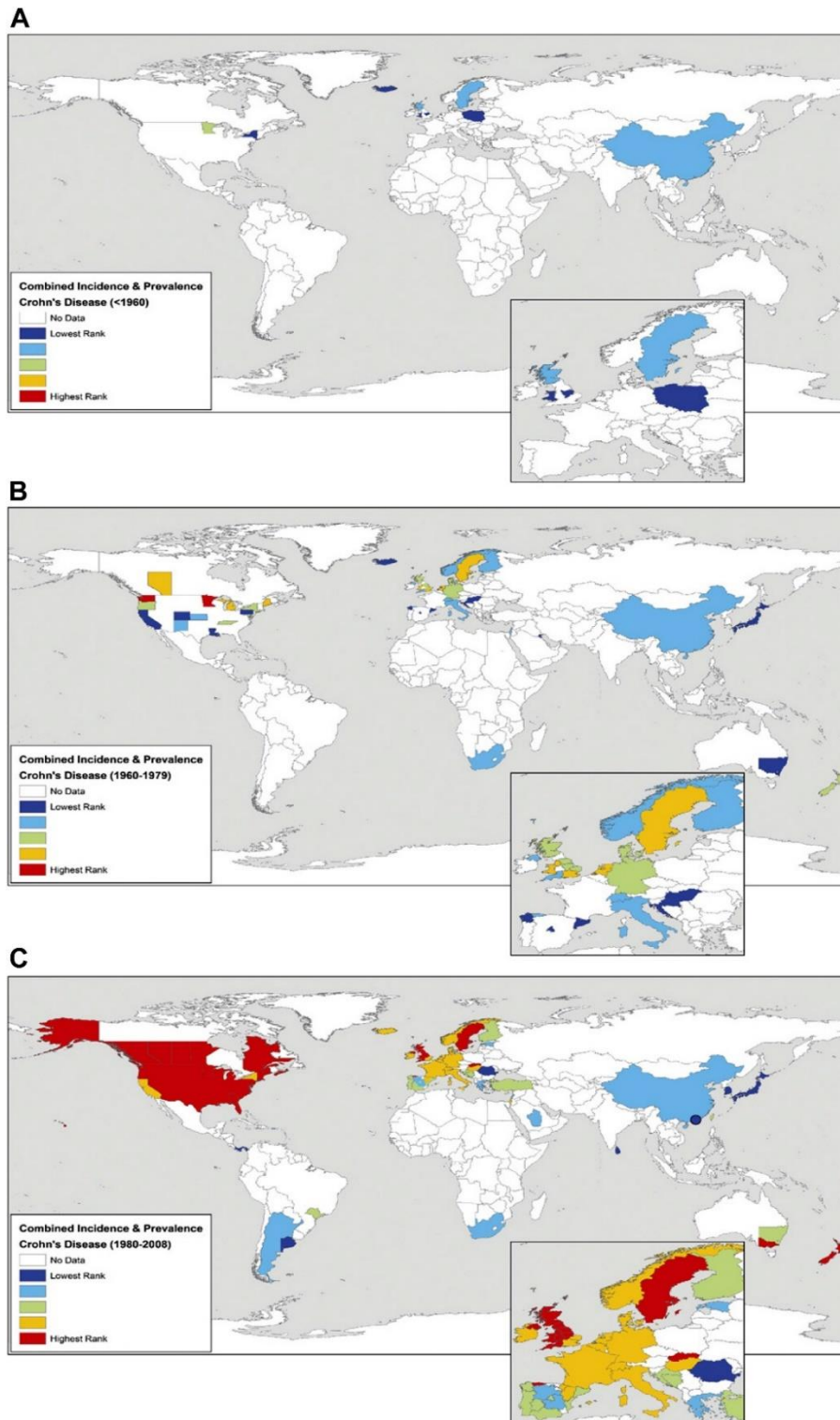


Figure 1: Taux d'incidence et/ou prévalence de la MC dans le monde entier (A) avant 1960, (B) de 1960 à 1979 et (C) après 1980. Les valeurs d'incidence et de prévalence ont été classées en quintiles représentant une faible occurrence à la maladie (bleu foncé et bleu pâle) à une occurrence intermédiaire (verte) à élevée (jaune et rouge)¹⁷.

III. Expression clinique des MICI

1. Symptomatologie :

Les MICI sont des pathologies qui affectent et altèrent la qualité de vie personnelle et professionnelle des patients^{18,19}.

La majorité des patients atteints de la MC présentent des diarrhées (chez 70-90% des patients) ou des diarrhées sanglantes, la malnutrition²⁰, des douleurs abdominales (chez 45-66% des patients), et une perte de poids (chez 65-70% des patients). Les saignements du rectum constituent un des symptômes les plus représentatifs chez les patients atteints de la MC à localisation rectale²¹.

Dans le cas de la RCH, les manifestations cliniques incluent les diarrhées sanglantes et glaireuses, une hémorragie de type pétéchiale, et les tissus de granulation²⁰.

2. Complications :

Les principales complications de la MC sont les maladies périanales qui incluent les fissures, les ulcères anales, les fistules, les abcès et les sténoses, qui dénotent généralement un phénotype très agressive de la MC²¹. D'autres complications peuvent se localiser en dehors de l'intestin et provoquer des manifestations rhumatismales (arthrite, spondylarthrite ankylosante), oculaires (uvéites, épisclérite) et/ou cutanées (érythème noueux, pyoderma gangrenosum), ainsi qu'au niveau du système hépatobiliaire (cholangite sclérosante primitive)^{21,22} (Figure 2).

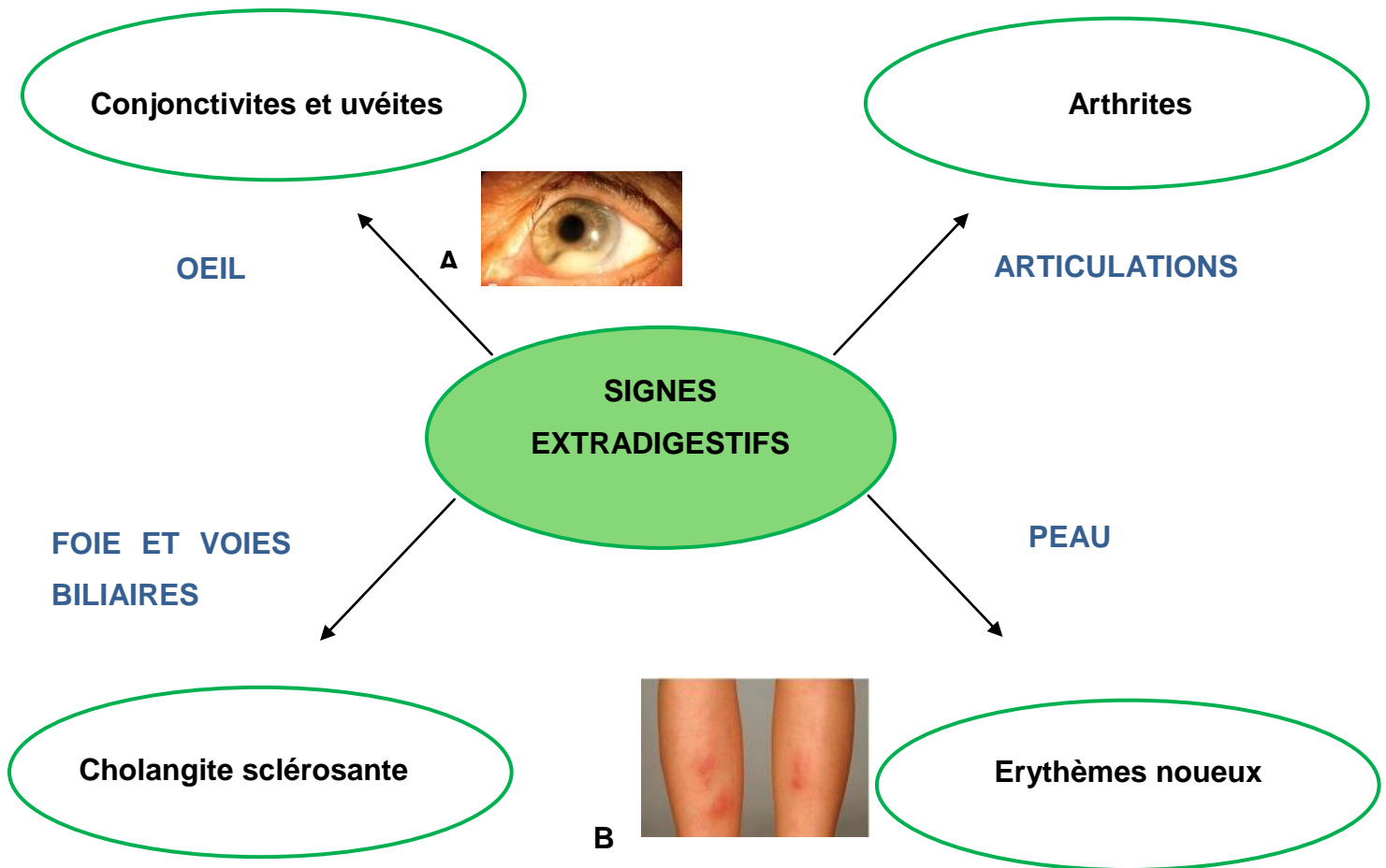


Figure 2: Principales manifestations extra-intestinales des MICI: A/ uvéite à hypopion et b/ érythème noueux^{22,23}.

IV. Diagnostic des MICI

Les manifestations cliniques d'une MICI sont aspécifiques et difficiles à discriminer d'une atteinte fonctionnelle du tube digestif²⁴. Le diagnostic d'une MICI résulte de l'association de données cliniques, biologiques (anémie, protéine C réactive (CRP) élevée, leucocytose), endoscopiques, histologiques et radiologiques^{25,26}.

1. Examens biologiques :

Les biomarqueurs constituent un rôle important dans la prise en charge des MICI. En effet, ces molécules biologiques peuvent contribuer au diagnostic précoce des MICI, à la détermination de l'activité de la maladie, et à la prédiction de la réponse au traitement

médical²⁷. Elles incluent la CRP, des biomarqueurs fécaux (calprotectine, lactoferrine, la néoptérine, la protéine S100A12...), des biomarqueurs immunologiques (anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiæ* (ASCA), anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (pANCA), flagelline bactérienne (Immunoglobuline G anti-CBir1)²⁷.

L'endoscopie reste toutefois l'examen incontournable de la prise en charge des MICI²⁸. Cette technique, permettant de visualiser l'intégralité du rectum et le côlon, apporte des précisions sur l'étendue de la maladie, sa sévérité et permet notamment de différencier les MICI entre elles²⁹.

2. Examens endoscopiques et histologiques :

2.1 Dans le cas de la MC :

Dans le cas de la MC, l'endoscopie montre classiquement une atteinte discontinue de la muqueuse intestinale alternant des zones saines avec des zones lésées³⁰. Histologiquement, la lésion élémentaire est le granulome épithéloïde et gigantocellulaire^{31,19} (Figure 3), présent dans 30 à 60% des cas³¹.

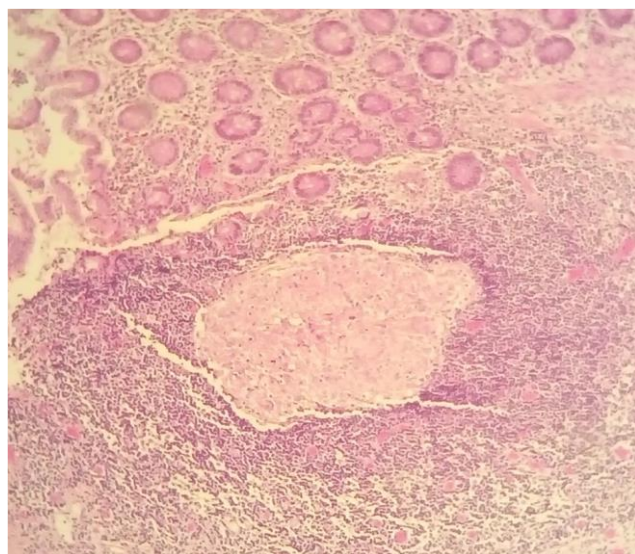
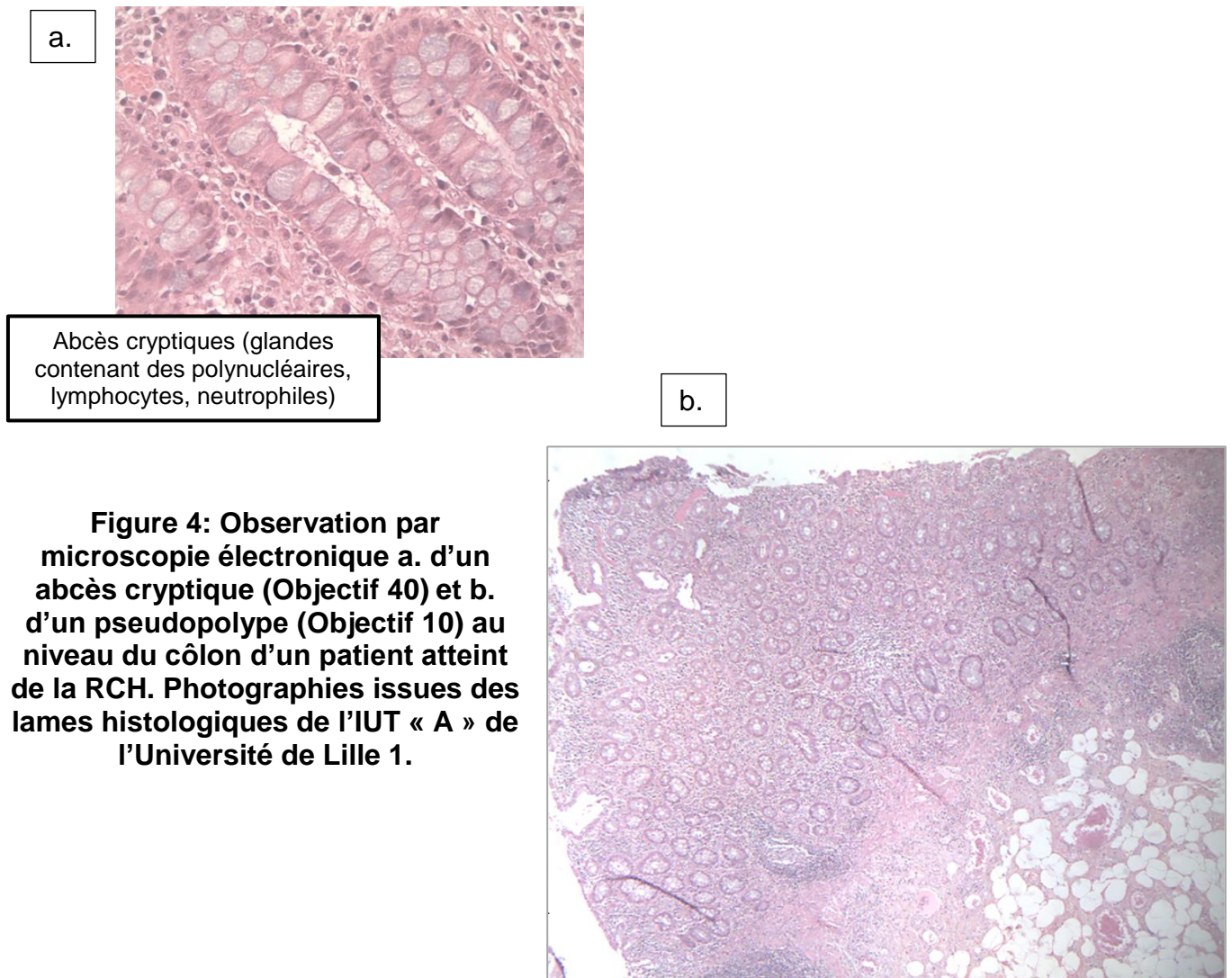


Figure 3: Observation par microscopie électronique d'une coupe de côlon chez un patient atteint de la MC: infiltration massive de lymphocytes T helper de type I et formation de granulome (Objectif 10). Photographie issue des lames histologiques de l'IUT « A » de l'Université de Lille 1.

2.2 Dans le cas de la RCH :

Dans le cas de la RCH, les lésions inflammatoires sont continues, sans intervalle de muqueuse saine et sans atteinte du haut tractus gastrointestinal³². Chez les patients présentant une RCH, l'examen microscopique révèle la présence d'anomalies épithéliales, des abcès cryptiques^{33,19} (Figure 4a), un infiltrat inflammatoire diffus transmuqueux³³ et des pseudopolypes³⁴ (Figure 4b).



Malheureusement, de nos jours, il n'existe aucun traitement curatif et la plupart des patients a recours à une résection chirurgicale ou un traitement médical à vie³⁵.

V. Stratégies thérapeutiques

L'approche des traitements contre les MICI consiste en trois objectifs principaux:

1. induire et maintenir la rémission;
2. prévenir les complications liées à la maladie;
3. améliorer la qualité de vie et minimiser les effets indésirables²².

Les stratégies de traitement sont orientées en fonction de la gravité de l'inflammation, et tiennent compte de l'histoire de la maladie⁵.

Les principales classes thérapeutiques utilisées dans le traitement des MICI sont : les anti-inflammatoires (incluant les aminosalicylés et les corticostéroïdes), les immunosuppresseurs, et les agents de biothérapie^{22,36,37,38}.

1. Dans la maladie de Crohn:

Dans la MC, la stratégie thérapeutique dépend à la fois de la localisation et de la sévérité de la maladie. Malgré cela, les traitements de la MC comprennent classiquement les aminosalicylés pour traiter les formes légères de la maladie, les corticoïdes pour les formes modérées, et les agents de biothérapie pour traiter les formes fistulisantes²⁰.

2. Dans la rectocolite hémorragique:

Dans le cas de la RCH, la stratégie thérapeutique dépend de la sévérité de la maladie. Lors des crises actives, les aminosalicylés (tels que la mésalamine ou acide 5-aminosalicylique (5-ASA)) sont des médicaments anti-inflammatoires utilisés en première intention. Si les 5-ASA sont inefficaces ou lors de poussées sévères, les corticoïdes sont prescrits en deuxième intention. Dans les formes sévères de la RCH, les immunosuppresseurs tels que la ciclosporine sont préconisés²⁰.

3. Traitement chirurgical:

La majorité des patients atteints de la MC aura recours à un traitement chirurgical au cours de la maladie, soit approximativement 50% des patients 10 ans après diagnostic de la maladie²¹. La chirurgie est indiquée dans de nombreuses situations incluant les

sténoses caractérisées par des symptômes obstructifs, les fistules, les complications infectieuses, en cas d'échec thérapeutique, de dépendance aux stéroïdes, de dysplasie ou de cancer³⁹.

CHAPITRE 2 : ETIOLOGIE DES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN.

Bien que des avancées majeures aient été réalisées ces dernières années dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques⁴⁰, l'étiologie des MICI reste néanmoins pas connue^{41,42}.

Les MICI sont des maladies multifactorielles associant:

- un terrain génétiquement prédisposé⁴³,
- des anomalies du système immunitaire^{43,44},
- des facteurs environnementaux (régime alimentaire, stress, dépression, influence des radicaux libres⁴³, tabac, statut hormonal, consommation de médicaments, hypothèse de l'hygiène),
- un déséquilibre de la flore intestinale^{43,44} (Figure 5).

Différentes mutations génétiques, l'exposition à des facteurs environnementaux et une perte d'homéostasie du microbiote intestinal sont impliquées en proportions variables dans la perte de la fonction de barrière de la muqueuse, son invasion par les microorganismes intestinaux et finalement, le déclenchement d'une réponse inflammatoire excessive et chronique provoquant les lésions caractéristiques de ces pathologies⁴⁵.

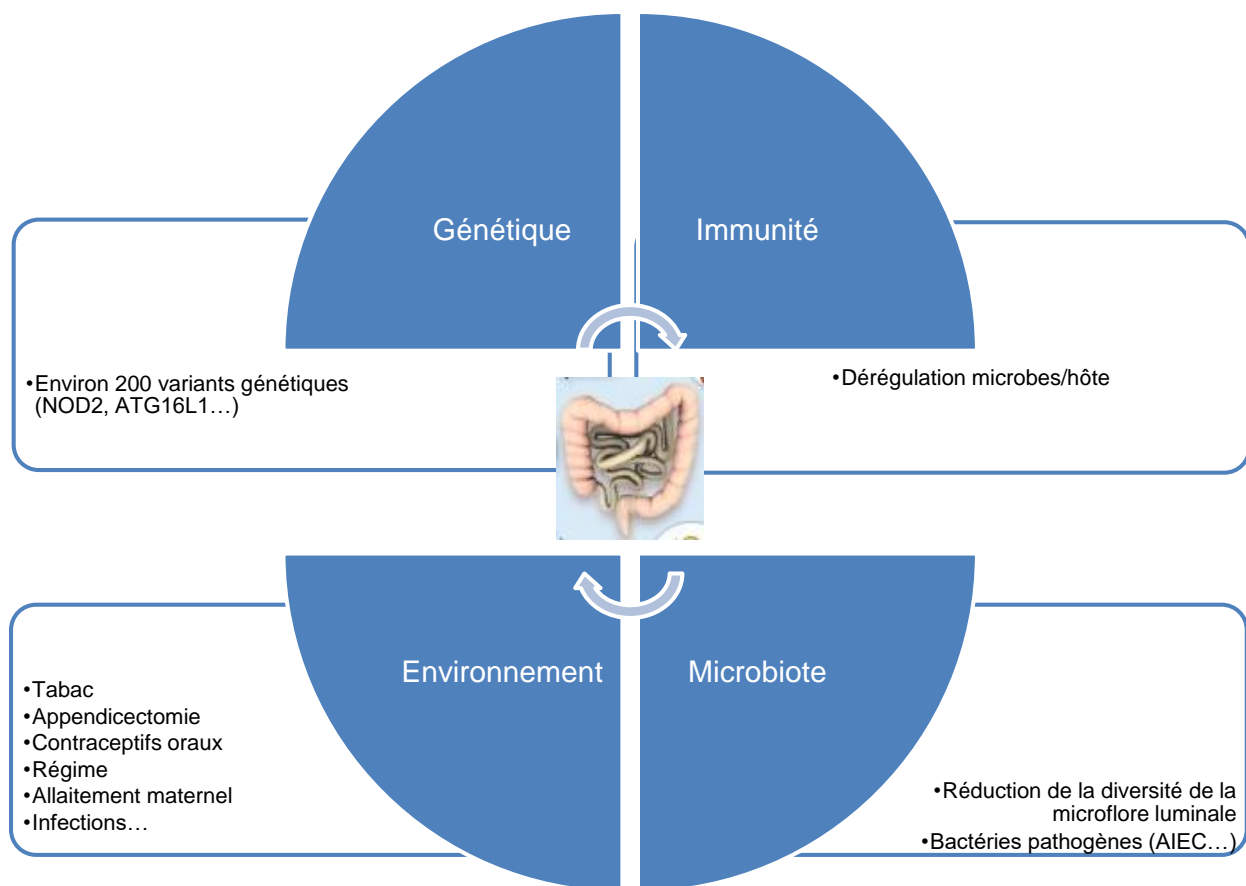


Figure 5 : Les MICI sont des pathologies complexes pour lesquelles les facteurs environnementaux, la génétique et la microflore intestinale entraîneraient une suractivation du système immunitaire et conduiraient à une inflammation chronique de l'intestin⁴⁶.

Débutons ce chapitre par les prédispositions génétiques associées aux MICI.

I- Facteurs génétiques :

Il existe plus de 200 variants génétiques associés aux MICI, qui sont impliqués dans les réponses immunitaires innées, dans l'immunité adaptative, dans l'autophagie, dans le stress du réticulum endoplasmique, dans les fonctions de barrière de l'épithélium intestinal et dans les mécanismes de défense bactérienne⁴⁷.

L'étude du génome humain et de ses polymorphismes a permis la mise en évidence des associations entre les MICI et certains gènes impliqués pour la plupart dans la reconnaissance et / ou la réponse antibactérienne (*NOD2*, *ATG16L1* et *IRGM*)⁴⁰.

L'association génétique la plus clairement établie est celle du gène *NOD2* avec la MC iléale⁴⁸.

1. Gène *NOD2* :

Le récepteur NOD2, également nommé caspase recruitment domain containing protein 15 (CARD15), encodé par le gène *NOD2*, est une protéine responsable de la fonctionnalité des cellules de Paneth dans la sécrétion de peptides antimicrobiens et de cytokines^{43,48} afin de contribuer à une autophagie efficace⁴³. Des mutations du gène *NOD2/CARD15* (IBD1), localisé sur le chromosome 16, ont été associées au développement des MICI (Figure 6). Plus de 30 mutations du gène *CARD15/NOD2* ont été identifiées chez les patients atteints de la MC. Celles qui sont les plus représentées sont les mutations R702W^{43,37} (Arg702 Trp)⁴⁹, G908R^{43, 37} (Gly908Arg)⁴⁹ et frameshift 1007fsinsC^{43, 37} (insertion de cytosine)⁴⁹ (Figure 6).

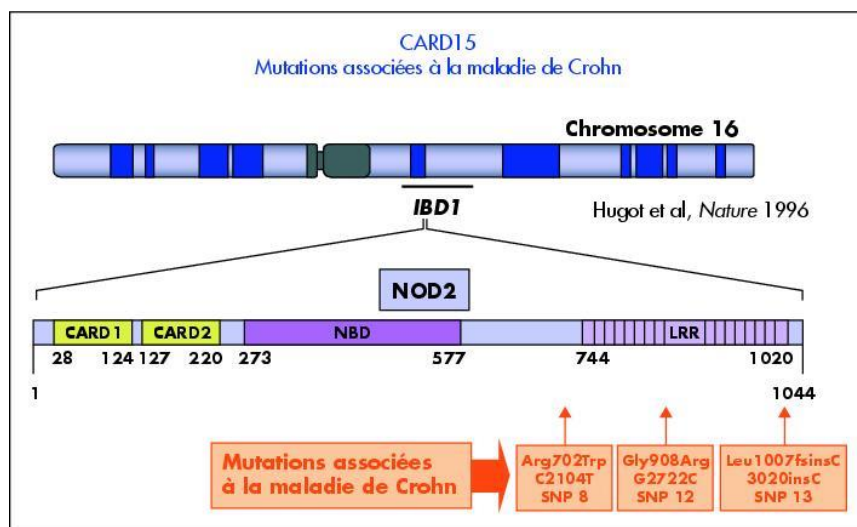


Figure 6 : Structure du gène et de la protéine NOD2/CARD15⁴⁹.

Dans des études réalisées chez l'homme et chez l'animal, des anomalies fonctionnelles du récepteur NOD2 étaient associées à une perturbation de la détection microbienne, à une production altérée de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth, à une mauvaise élimination des bactéries intracellulaires et une signalisation immunitaire rompues⁵⁰. En effet, en condition d'homéostasie intestinale, le

muramyldipeptide (MDP) active le récepteur NOD2 exprimé par les cellules de Paneth pour induire la production des α -défensines. Les α -défensines exercent alors des effets bactéricides contre la microflore intestinale afin de contrôler la concentration bactérienne au niveau de l'iléon terminal. En présence de polymorphismes du gène *NOD2* associés à la MC, la production des α -défensines par les cellules de Paneth pourrait être réduite, ce qui entraîne une augmentation de la concentration de la microflore dans l'intestin grêle⁵¹ (Figure 7).

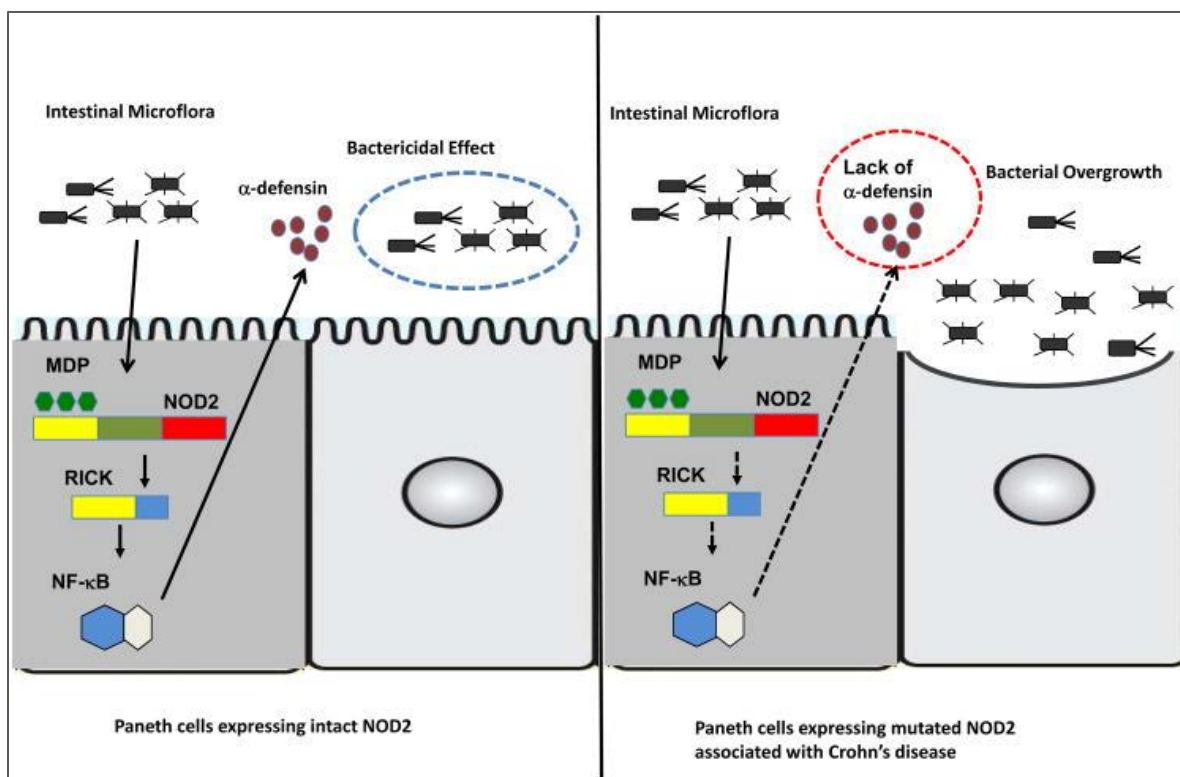


Figure 7 : Altérations de la production des α -défensines par les cellules de Paneth en cas de mutations du gène *NOD2* chez les patients atteints de la MC⁵¹.

2. Gène *ATG16L1* :

Des polymorphismes du gène Autophagy Related 16 Like 1 (*ATG16L1*), impliqué dans l'autophagie, sont associés à un risque de MC. La mutation T300A au niveau du gène *ATG16L1* entraîne une dégradation de la protéine *ATG16L1* et une autophagie réduite. L'autophagie regroupe plusieurs voies de dégradation lysosomale des constituants cellulaires, essentielles à l'homéostasie cellulaire. Et des changements des voies de l'autophagie entraîneraient ainsi des modifications de l'homéostasie intestinale

et prédisposeraient donc aux MICI⁵². Les gènes *ATG16L1* mutés affectent les cellules dendritiques et une perturbation de leurs fonctions entraînerait des changements de la microflore intestinale⁴³.

3. Gènes *IRGM* et *MDR1* :

D'autres gènes tels que *IRGM* pour Immunity-related guanosine triphosphatase et *MDR1* (Multidrug resistance) semblent jouer un rôle important dans le développement des MICI. Les polymorphismes du gène *IRGM* contribuent au développement des MICI par des altérations de la xénophagie^a.

Une altération de la xénophagie entraîne une persistance des bactéries intracellulaires. Les mutations du gène *MDR1*, localisé sur le chromosome 7 sont également en lien avec le développement des MICI et elles semblent être plus fréquentes chez les patients atteints de la RCH⁴³.

II- Anomalies du système immunitaire :

Dans les MICI, la perméabilité intestinale est perturbée, ce qui favorise l'entrée des antigènes/bactéries luminaux dans la lamina propria. Les motifs bactériens sont reconnus par un groupe de récepteurs, les Toll Like Receptors (TLR). Ces derniers deviennent alors actifs et vont stimuler des cascades de signalisations qui vont aboutir à la production de cytokines pro-inflammatoires et à l'induction de signaux de co-stimulation pour initier la réponse immunitaire adaptative effectrice. La stimulation des cellules dendritiques par l'antigène entraîne le recrutement et la formation de différents sous-types de populations lymphocytaires (Th1, Th2 et Th17). La RCH semble être surtout médiée par une réponse immunitaire de type Th2 alors que la MC semble être médiée par une réponse de type Th1 et Th17⁵³ (Figure 8).

^a La xénophagie correspond à une dégradation par la voie autophagique de microorganismes intracellulaires.

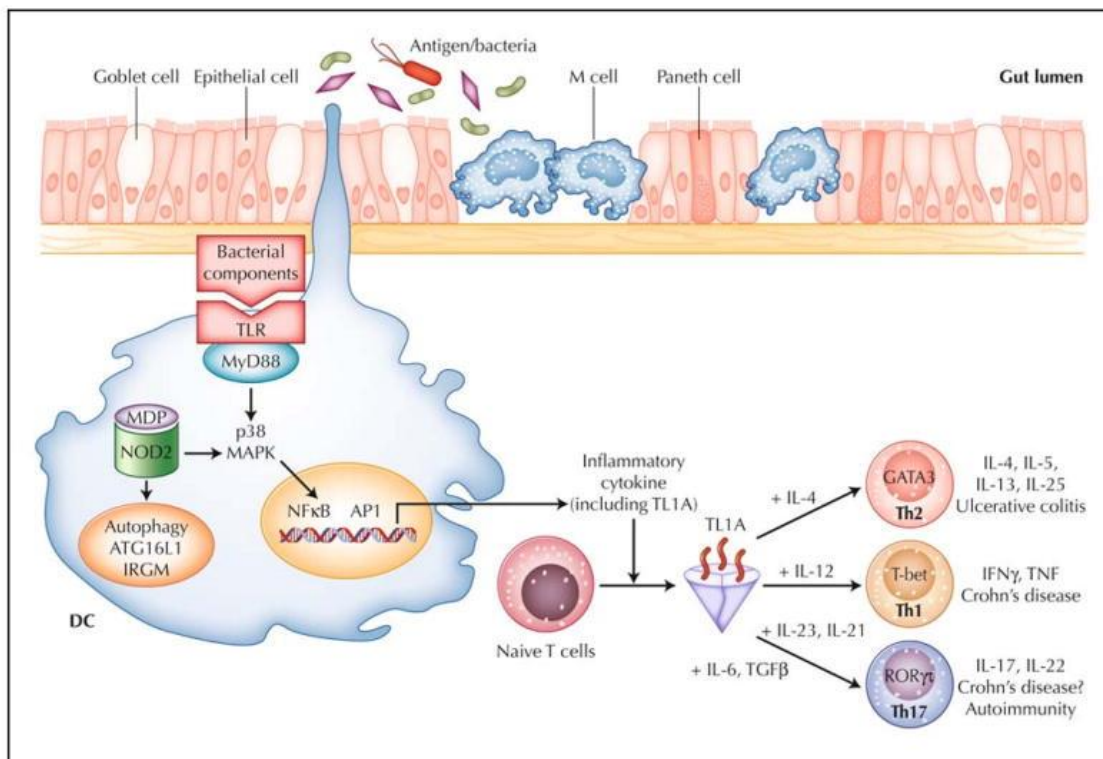


Figure 8 : Hypothèses des mécanismes physiopathologiques des MICI⁵³.

III- Facteurs environnementaux :

De nombreux facteurs environnementaux sont incriminés dans le développement des MICI, parmi eux le tabagisme, l'antibiothérapie, l'alimentation, l'allaitement maternel, le stress, l'influence des radicaux libres, l'hypothèse de l'hygiène⁴³.

1. Tabagisme :

Le tabagisme joue un rôle double dans le développement et la progression des MICI. D'une part, fumer augmente le risque de développer la MC et ce risque est réduit seulement après 4 ans d'arrêt. D'autre part, le tabagisme semble soulager les symptômes de la RCH⁴³.

2. Antibiothérapie :

L'exposition aux antibiotiques (ATB) durant la petite enfance est supposée interférer avec le processus normal de développement de tolérance aux bactéries entériques¹⁷. Les ATB altèrent la composition du microbiote intestinal en réduisant la résistance à la colonisation contre des microorganismes opportunistes. L'étendue de ces effets dépend du spectre de l'agent, de sa pharmacocinétique et de la dose et durée du traitement. Dans de nombreux cas, ces perturbations ne sont que temporaires, mais les expositions se produisant tôt dans la vie, notamment chez les nourrissons et durant la petite enfance, contribuent à une altération durable de la composition de la flore bactérienne⁵⁴.

De nombreuses études soulignent le possible rôle des ATB parmi les facteurs de risque de développement des MICI. Une analyse prospective canadienne a en effet montré un risque relatif élevé de développer des MICI chez les patients ayant reçu un traitement ATB au cours des années précédant le diagnostic (4 à 5 ans)⁵⁵.

3. Alimentation :

Les pays développés ou « occidentalisés » sont à forte incidence et prévalence de MICI^{46,56}. Le régime alimentaire « occidental » est un régime riche en graisses et en protéines et pauvre en fibres⁴⁶. L'alimentation semble donc jouer un rôle important dans les MICI. L'alimentation influencerait l'inflammation intestinale à travers différents mécanismes biologiques plausibles, comme la présentation de l'antigène, le déséquilibre des prostaglandines et des altérations de la microflore^{57,58}.

Une alimentation pauvre en protéines, en fruits, et en légumes et à contrario, une alimentation riche en sucres, graisses animales⁴³, et en glucides raffinés⁵⁹ constitueraient un facteur de risque de développement des MICI. Une consommation quotidienne accrue en graisses animales, en protéines animales et en protéines de lait a été constatée chez les patients atteints de la MC. Une corrélation positive a pu être établie entre le développement de MICI et la consommation de sucrose, de coca cola, de chocolat et de chewing-gum. A l'inverse, un risque moindre de déclaration de MICI a pu être observé suite à la consommation d'agrumes, de légumes, de poissons, d'oméga 3. Cependant,

un lien direct entre l'alimentation et la maladie n'a pas encore été prouvé. Selon certaines publications, l'alimentation n'est pas un agent étiologique des MICI, mais peut influencer l'activité métabolique et contribuer à la progression de la maladie⁴³.

4. Allaitement maternel :

L'allaitement maternel peut réduire le risque de développer une MICI. Il est important pour l'acquisition de la tolérance orale à la microflore et aux antigènes alimentaires. Le mécanisme par lequel l'allaitement peut avoir un effet bénéfique est sans doute multifactoriel. À noter que les préparations pour nourrissons, contrairement au lait maternel, ne contiennent pas de lactoferrine et d'oligosaccharide, complexes protéiques ayant des activités antibactériennes, antivirales, et anti-inflammatoires⁴⁶.

5. Hypothèse de l'hygiène :

Il apparaît de plus en plus clairement que les conditions sanitaires drastiques dans les pays développés pourraient expliquer l'association des patients souffrant de MICI avec le niveau d'industrialisation du pays. Selon cette hypothèse, en provoquant une baisse de l'exposition à des agents microbiens et parasitaires, l'amélioration des conditions d'hygiène pourrait contribuer à une fragilisation de l'immunité en provoquant une défaillance de l'apprentissage du système immunitaire. Cette défaillance instaure alors une réponse immunitaire excessive lors de l'exposition ultérieure à des antigènes environnementaux. Cette hypothèse est renforcée par le fait que d'une part, cette baisse d'exposition aux agents microbiens est corrélée avec une augmentation des allergies, des maladies auto-immunes et des maladies inflammatoires chroniques incluant la MC et la RCH et d'autre part, par le très faible nombre de cas de patients atteints de MICI au sein des populations en contact permanent avec des bactéries et des parasites potentiellement pathogènes⁴⁵. L'hypothèse de l'hygiène ne peut cependant pas être appliquée à toutes les populations du monde. Par exemple, en Inde, les faibles mesures en l'hygiène, sont inopinément associées à un risque accru de RCH⁴⁷.

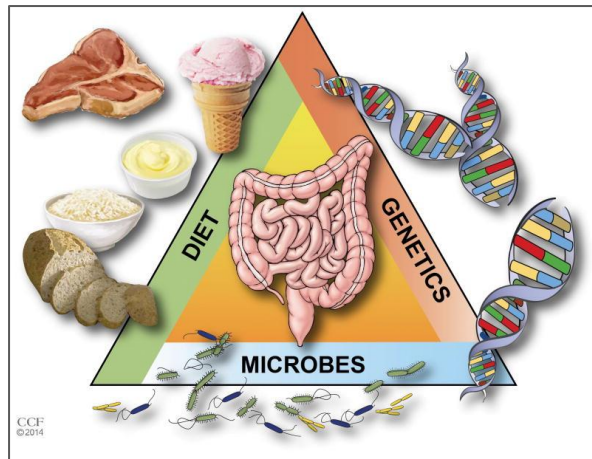
6. Espèces réactives de l'oxygène :

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre les processus oxydatifs, qui sont responsables de la formation des espèces réactives de l'oxygène et les systèmes antioxydants. Le stress oxydatif est en lien avec les pathologies cardiovasculaires, les désordres métaboliques, mais aussi les cancers et possiblement les MICI. Durant le développement de la maladie, les lymphocytes T et les lymphocytes B s'accumulent dans l'intestin afin d'éradiquer les éléments étrangers, engendrant principalement une augmentation de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène (radical superoxyde, hypochlorite). Cependant, l'accumulation du radical hydroxyl peut causer la dépolymérisation du mucus dans les cellules du gros intestin, éradiquant son effet protecteur. Simultanément, les lymphocytes T et les lymphocytes B, les mastocytes et monocytes sanguins et les macrophages de la muqueuse relarguent des quantités importantes de protéases, tels que l'élastase, la collagénase et la cathépsine G, qui perturbent les connections intercellulaires et entraînent des dommages de l'épithélium intestinal. Les dommages au niveau des jonctions cellulaires conduisent donc à une pénétration accrue des bactéries dans la lamina propria, à une stimulation des lymphocytes T et à la production de cytokines pro-inflammatoires, qui aggravent les MICI⁴³.

7. Troubles de l'humeur et facteurs psychosociaux :

L'anxiété et la dépression pourraient être une cause ou une conséquence des MICI. Des études ont montré par exemple que les symptômes des troubles de l'humeur contribueraient significativement au développement de la RCH. Le stress semble également jouer un rôle conséquent dans les MICI. Le stress induit l'activation de l'axe hypothalamus-hypophyso-surrénalien, qui inhibe le système immunitaire, perturbe les fonctions digestives et induirait des réactions inflammatoires chez les patients atteints de MICI⁴³.

En plus des facteurs génétiques et environnementaux, de plus en plus d'arguments associent les MICI à une diminution de la biodiversité du microbiote intestinal et à son déséquilibre appelé dysbiose^{60,61,62} (Figure 9).



Hypothèse de l'hygiène :

Avoir des animaux domestiques durant l'enfance, vivre à la campagne, boire du lait pasteurisé, vivre dans une grande famille sont des éléments de vie inversement associés à un risque de développer une MICI.

Facteurs environnementaux :

Introduction des aliments emballés, des chaînes de fast food, utilisation accrue d'ATB, consommation accrue en graisses (acides gras monoinsaturés et polyinsaturés) et en sucres, et une consommation moindre en fibres alimentaires sont associées à un risque de MICI. Les additifs alimentaires- saccharine, sucralose, carboxyméthylcellulose, les émulsifiants les plus courants (incluant les polysorbates, ester de sorbate, lécithine), augmenteraient le risque de MICI.

	MC	RCH
Tabagisme	⊕ chez les Caucasiens et migrants du Moyen-Orient	⊖ chez les Caucasiens et chez les Asiatiques
Utilisation d'ATB durant l'enfance	⊕ chez les Caucasiens ⊖ chez les Asiatiques et migrants du Moyen-Orient	⊕ chez les Caucasiens ⊖ chez les Asiatiques et migrants du Moyen-Orient
Allaitement maternel	⊖ chez les Asiatiques et chez les Caucasiens	⊖ chez les Asiatiques et chez les Caucasiens
Contraceptifs oraux	⊕ chez les Caucasiens	/
Appendicectomie	⊕ chez les Caucasiens	⊖ chez les Caucasiens
Faible taux en vitamine D	⊕ chez les Caucasiens	⊕ chez les Caucasiens
Consommation de thé ou café	⊖ chez les Asiatiques	⊖ chez les Asiatiques

Génétique : Environ 200 mutations génétiques associées à un risque de MICI (37 spécifiques à la MC et 32 pour la RCH) ont été découvertes.

⊕ : facteur de risque

⊖ : effet protecteur

Figure 9 : Les déterminants génétiques, environnementaux et microbiens associés aux MICI^{59,47}.

IV- Rôle de la microflore bactérienne:

1. Généralités :

Après avoir longtemps parlé de flore intestinale, on donne aujourd'hui à l'ensemble des microorganismes qui peuplent l'intestin le nom de microbiote intestinal⁶³. Le microbiote se définit comme l'ensemble des microorganismes qui colonise l'organisme, et inclut aussi bien les bactéries que les virus, les champignons, les archées et les protozoaires⁶⁴. Il constitue un écosystème extrêmement complexe où les trois principaux acteurs (le microbiote, les nutriments et les cellules de l'hôte) sont en contact permanent et donc interagissent, faisant du microbiote un véritable partenaire⁶³.

Chez l'être humain, le microbiote intestinal renferme environ 10^{14} bactéries, soit 10 fois le nombre de cellules eucaryotes de l'organisme. Les espèces bactériennes le composant sont très diverses, représentant des millions de gènes. Cette biomasse peut être considérée comme un véritable « organe » et assure de nombreuses fonctions utiles au bien-être et à la santé de l'hôte⁶³.

2. Mise en place du microbiote intestinal :

La colonisation bactérienne est établie immédiatement après la naissance, par contact direct avec le microbiote maternel et peut être influencée pendant la lactation⁶⁵. Au cours des trois premiers mois de vie, les bactéries du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* colonisent le tractus intestinal chez le nourrisson en raison de l'ingestion de lait maternel⁶⁶. Au fur et à mesure de son installation, le microbiote va pouvoir exprimer ses propriétés physiologiques et devenir essentiel pour le développement harmonieux de l'hôte⁶⁷.

3. Stabilité :

Le microbiote intestinal se diversifie au cours des premiers mois de vie⁶³. Il se stabilise vers l'âge de 3 ans⁶³. A cet âge, un équilibre des populations bactériennes intestinales est atteint, avec une biodiversité phylogénétique et fonctionnelle voisine de celle de l'adulte. Cette diversité est alors caractérisée, à l'inverse du microbiote en cours d'établissement, par une plus forte proportion d'espèces anaérobies, notamment de

Firmicutes, et d'une plus faible proportion de bactéries anaérobies facultatives, ces dernières s'établissant en sous-dominance chez l'adulte avec *E. coli* comme espèce majoritaire. Son interaction avec le système immunitaire contribue à l'homéostasie intestinale et au développement du système immunitaire de l'enfant. La composition du microbiote peut être altérée au cours de la vie en fonction des conditions environnementales et des différents stress rencontrés (infections bactériennes, traitement ATB, chirurgie, changements des habitudes alimentaires)^{63,68}.

4. Fonctions du microbiote intestinal :

Le microbiote intestinal d'un individu adulte est composé de 500 à 1000 espèces bactériennes différentes vivant en symbiose avec l'organisme et jouant un rôle essentiel dans la physiologie de l'intestin, notamment en permettant la fermentation colique des nutriments, en empêchant la colonisation de l'intestin par des microorganismes pathogènes, ou encore en permettant le développement et la maturation du système immunitaire intestinal⁴⁵.

Les bactéries intestinales sont capables de produire une variété de vitamines, de synthétiser tous les acides aminés essentiels et non essentiels et d'effectuer une biotransformation de la bile⁶⁹. Le microbiote intestinal d'un individu sain participe également au métabolisme des nutriments de l'hôte, des xénobiotiques et des médicaments, au maintien de l'intégrité structurelle de la barrière intestinale, à l'immunomodulation et à la protection contre les agents pathogènes⁶⁴.

4.1 Métabolisme des nutriments

Le microbiote intestinal est en effet capable de convertir une grande variété de substrats (y compris les sucres, les protéines et les lipides) conduisant à la production d'une large gamme de métabolites. La plupart de ces métabolites ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte⁷⁰.

Les bactéries symbiotiques métabolisent les composés indigestes, fournissant ainsi à l'organisme des nutriments essentiels, se défendent contre la colonisation par des agents pathogènes opportunistes et contribuent à la formation de l'architecture intestinale. Par

exemple, certaines souches du microbiote intestinal (*Bifidobacterium spp* et *Clostridium spp*) sont impliquées dans la digestion de certains aliments non digérés dans l'estomac et l'intestin grêle (fibres alimentaires telles que les xyloglucanes), et jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie énergétique^{71,72}. Cette fonctionnalité aboutit à la récupération d'énergie et des substrats absorbables pour l'hôte mais également à une source d'énergie et de nutriments pour la croissance et la prolifération bactérienne⁶⁹. Après décomposition des fibres indigestes, le microbiote intestinal normal produit alors entre 50-100 mmol.L⁻¹ par jour d'acides gras à chaîne courte (short chain fatty acids SCFA), tels que les acides acétique, propionique et butyrique, éléments essentiels pour maintenir la santé et l'intégrité des cellules épithéliales du côlon⁷². Ces SCFA peuvent être rapidement absorbés par le côlon et exercent de nombreux rôles divers dans la régulation de la motilité intestinale, de l'inflammation, de l'homéostasie du glucose et de la formation d'énergie. En outre, le microbiote intestinal fournit des vitamines à l'hôte, tels que les folates, la vitamine K, la biotine, la riboflavine (B2), la cobalamine (B12) et éventuellement d'autres vitamines B⁷¹ (Figure 10).

4.2 Protection de l'hôte et développement du système immunitaire

L'épithélium intestinal est situé à l'interface entre le milieu intérieur tissulaire et la lumière intestinale. Le développement du système immunitaire de l'hôte est affecté par des interactions continues et dynamiques avec le microbiote intestinal et ses métabolites. Les bactéries font partie intégrante du développement précoce du système immunitaire intestinal. Afin de maintenir l'homéostasie intestinale et d'éviter une invasion par des agents pathogènes, les cellules de l'épithélium intestinal - après reconnaissance entre des récepteurs spécifiques de l'hôte et des molécules spécifiques associées à des bactéries - activent le système immunitaire inné déclenchant ainsi une réponse immunitaire de l'hôte et entraînant la libération de peptides antimicrobiens, de cytokines et de globules blancs. S'ensuit une réponse protectrice aux bactéries commensales, une réponse inflammatoire aux organismes pathogènes⁶⁹ (Figure 10)⁷³. A titre d'exemple, l'espèce bactérienne *Faecalibacterium prausnitzii* ou certaines souches appartenant aux genres *Bifidobacterium* ou *Lactobacillus* exercent une activité antimicrobienne après une

interaction avec le système immunitaire, se soldant par la synthèse de cytokines anti-inflammatoires⁶⁷.

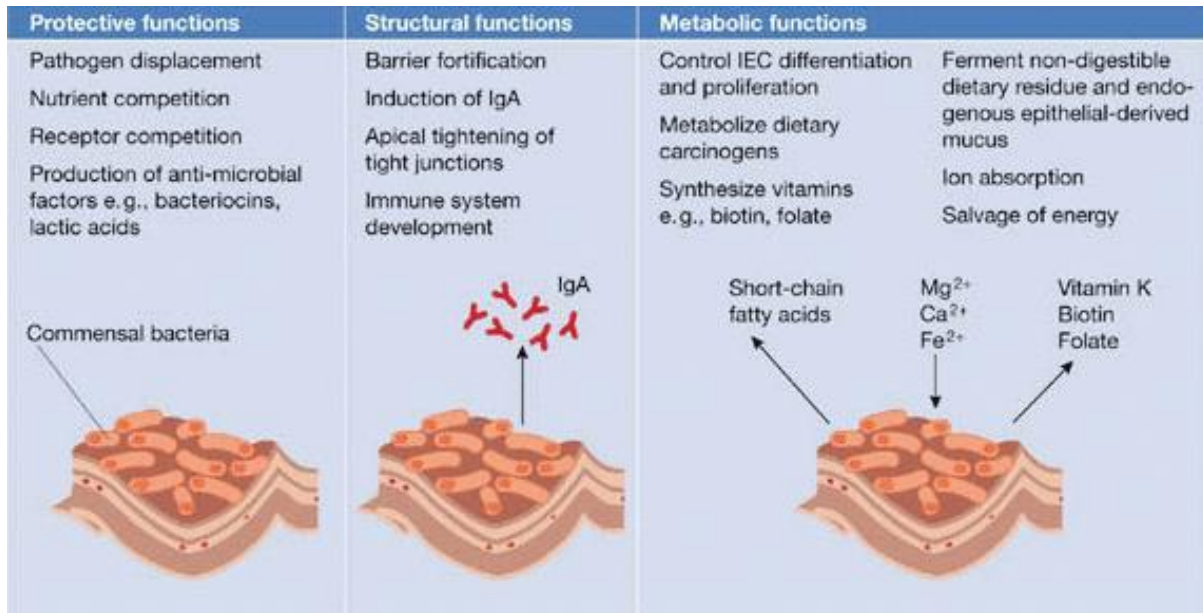


Figure 10 : Fonctions du microbiote intestinal⁷³.

5. Composition du microbiote intestinal :

Le microbiote intestinal est composé de 4 phyla (grands groupes) bactériens majoritaires: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria et Proteobacteria, dont les proportions sont régulées en permanence⁴⁵.

Le microbiote est diversement réparti dans l'organisme, la concentration et la biodiversité les plus élevées se situant au niveau du côlon⁶³ (Figure 11).

Les portions proximales du tractus gastro-intestinal (l'estomac, le duodénum) renferment des niveaux beaucoup plus élevés en oxygène et sont donc peuplées d'un pourcentage plus élevé de bactéries aérobies anaérobies facultatives (AAF). La partie distale de l'intestin grêle ainsi que le côlon contiennent quant à eux peu ou pas d'oxygène, ce qui facilite la croissance des anaérobies obligatoires⁶⁶ (Figure 11).

Le nombre de bactéries augmente progressivement depuis l'estomac (moins de 10^4 par gramme de contenu) jusqu'au côlon (10^{11} à 10^{12} par gramme) en passant par le duodénum (10^3 à 10^4 par gramme), le jéjunum (10^5 à 10^6 par gramme) et l'iléon (10^7 à 10^9 par gramme)⁶⁷.

Chez l'adulte, la composition du microbiote colique se caractérise par une association relativement stable d'espèces dominantes majoritairement anaérobies strictes (soit en termes de bactéries cultivables, 10^9 à 10^{11} unités formant colonies (UFC)/g de selles). Le microbiote sous-dominant (10^6 à 10^8 UFC/g de selles) est composé d'espèces aérobies-anaérobies facultatives (entérobactéries, entérocoques, lactobacilles). Enfin, il existe une population en transit de niveau de population en général inférieur à 10^6 UFC/g de contenu intestinal⁶³.

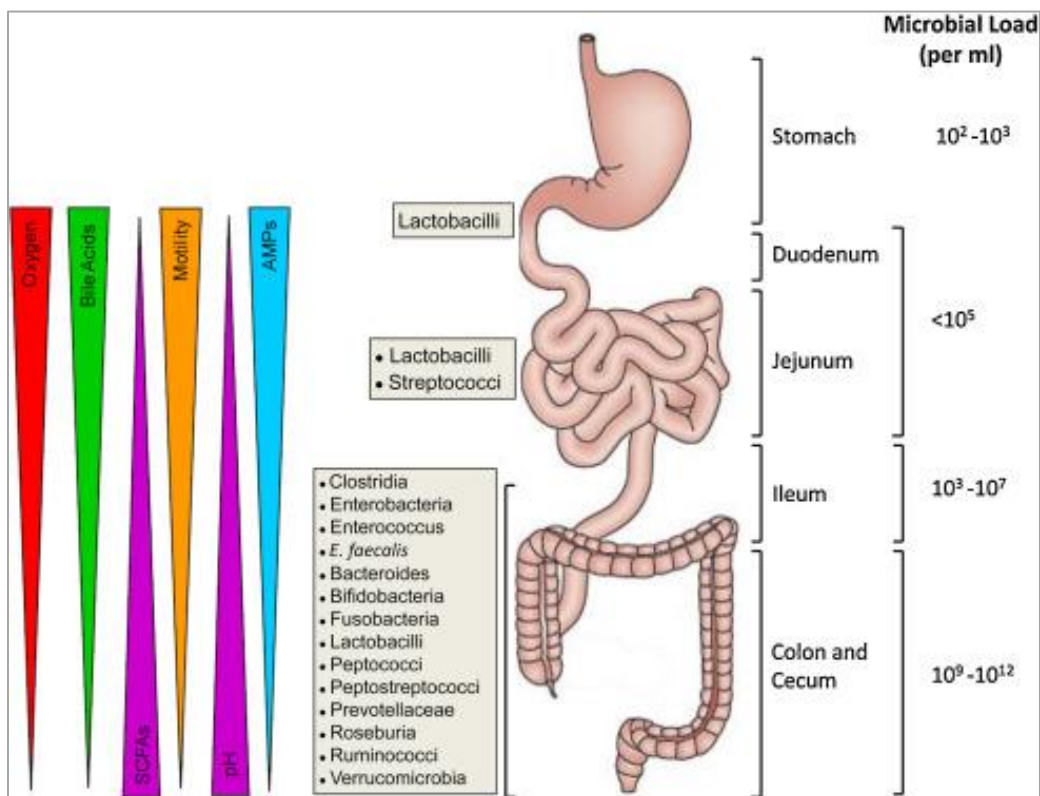


Figure 11 : Répartition des communautés microbiennes et des gradients physiologiques le long du tractus gastro-intestinal de l'hôte humain⁶⁶.

6. Maintien de l'homéostasie intestinale par les mécanismes immunitaires :

Plusieurs mécanismes immunitaires agissent en concert avec le microbiote intestinal et contribuent à l'homéostasie intestinale. Ces mécanismes permettent la formation d'une population bactérienne relativement stable et de limiter la colonisation par des bactéries pathogènes.

- Le premier mécanisme concerne le rôle des cellules épithéliales à former une barrière physique permettant de séparer le contenu luminal des compartiments immunitaires sous-jacents, bloquant ainsi l'entrée de la microflore dans la lamina propria⁷⁴.
- Deuxièmement, les cellules sécrétoires du tractus gastro-intestinal, telles que les cellules plasmatiques, les cellules en gobelet et les cellules de Paneth, produisent des protéines immunoglobines A (IgA), des mucines et des protéines antimicrobiennes, respectivement; elles représentent les principaux composants de la muqueuse intestinale, qui fonctionnent comme une ligne de défense pour réduire la colonisation microbienne de l'épithélium⁷⁵.
- Troisièmement, les métabolites qui dérivent du microbiote ou de petites molécules à propriétés bactéricides ou bactériostatiques favorisent une résistance à la colonisation par des espèces pathogènes⁷⁵.
- Quatrièmement, la couche de mucus, dont le principal composant est la mucine 2 (MUC2) sécrétée par les cellules en gobelet du petit et du grand intestin, participe à la réponse immunitaire en formant une barrière physique entre le contenu intestinal et la muqueuse intestinale^{76,74}.
- Cinquièmement, lorsque les bactéries commensales pénètrent dans les cellules épithéliales intestinales, les systèmes d'immunité innée et adaptative sont activés afin d'éliminer le microbiote⁷⁵.

Ainsi, la combinaison des mécanismes mentionnée ci-dessus permet le maintien de la balance dynamique entre les bactéries commensales et le système immunitaire de l'hôte assurant ainsi une homéostasie intestinale⁷⁵ (Figure 12).

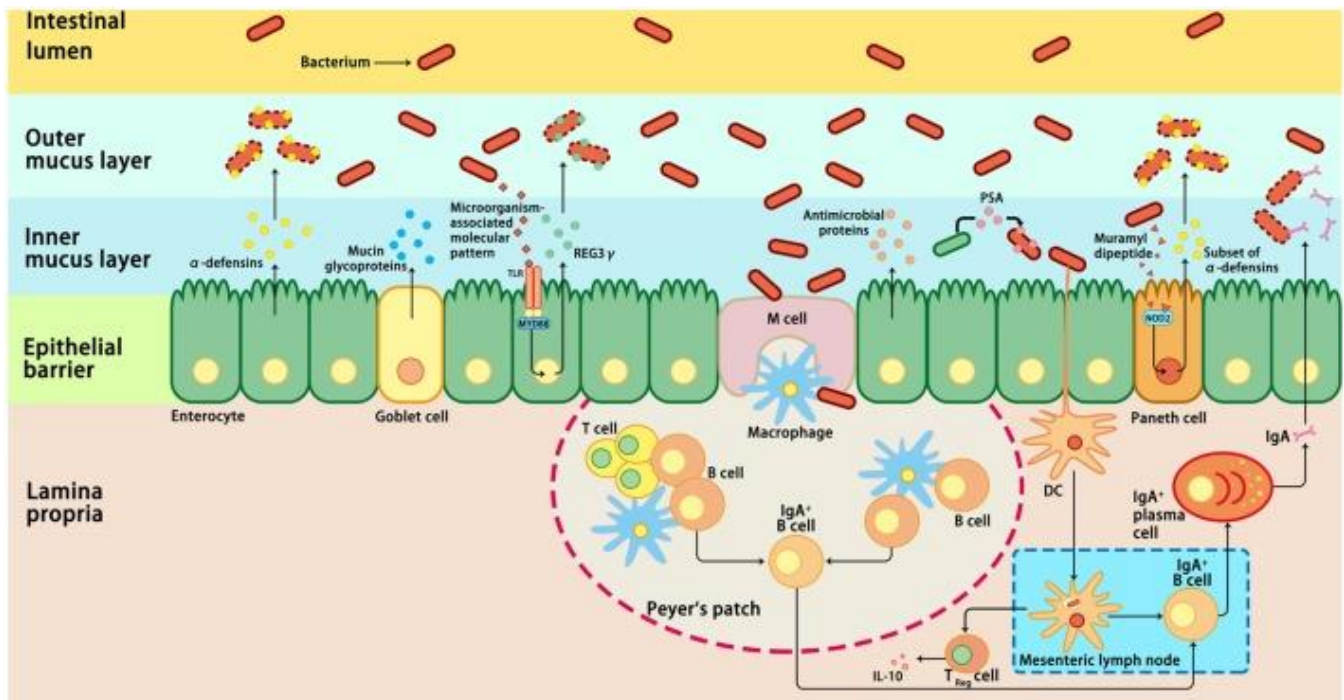


Figure 12 : Mécanismes immunitaires et microbiote intestinal contribuent au maintien d'une homéostasie intestinale⁷⁵.

Différents arguments sont en faveur du rôle du microbiote intestinal dans la physiopathologie des MICI.

- ✚ En premier lieu, le rôle des bactéries dans la pathogénie des MICI est supporté par les travaux réalisés chez des modèles animaux de MICI dépourvus de bactéries. Sur ces modèles animaux axéniques ou « germ-free », l'inflammation intestinale expérimentale ou spontanée n'a pas lieu soulignant ainsi l'importance du microbiote dans le déclenchement d'une inflammation intestinale⁷⁷. En outre, il a été montré que lorsque les rats transgéniques HLA-B27 (Human leukocyte antigen B27), génétiquement sensibles à la colite, sont élevés en condition axénique, ils ne développent pas de maladie inflammatoire intestinale⁷⁸.
- ✚ En second lieu, la mise en évidence de taux élevés d'anticorps (Ac) dirigés contre des agents microbiens retrouvés au niveau intestinal (Ac anti-ASCA, Ac anti-OmpC, anti-flagelline CBir1) chez les patients atteints de la MC conforte

l'hypothèse de l'implication d'agents microbiens dans la physiopathologie des MICI⁷⁸. A noter qu'approximativement 80% des patients atteints de MC développent des Ac dirigés contre au moins un de ces antigènes⁷⁹.

✚ En troisième lieu, le microbiote joue un rôle essentiel dans le développement et la maturation du système immunitaire, et donc sur ses fonctions⁷⁸. Les animaux axéniques ont en effet de nombreuses anomalies au niveau du système immunitaire intestinal : hypoplasie des plaques de Peyer, nombre de lymphocytes intraépithéliaux réduits, déficit en certaines populations lymphocytaires T, sécrétion intestinale d'IgA réduite, concentration d'immunoglobulines sériques et production de cytokines limitées. Les anomalies observées ne se limitent cependant pas à l'épithélium intestinal puisque la rate et les ganglions lymphatiques des animaux axéniques sont non structurés et présentent des zones lymphocytaires atrophiées. L'ensemble de ces anomalies peuvent être « réparées » en quelques semaines en inoculant un microbiote de souris conventionnelle à ces souris axéniques. La composition du microbiote joue donc un rôle majeur dans l'équilibre entre les populations lymphocytaires Th17 et Treg, indispensable au maintien de l'homéostasie intestinale⁸⁰.

✚ En quatrième lieu, chez des sujets sains, un équilibre existe entre le système immunitaire du tractus gastro-intestinal et le microbiote résident. Cependant, en cas d'infections, la barrière de la muqueuse intestinale est temporairement perturbée pouvant induire des réponses immunitaires dirigées non seulement vers les agents pathogènes, mais aussi vers les bactéries commensales. En effet, après des infections répétées, les lymphocytes T mémoires et effecteurs dirigés contre les bactéries commensales s'accumulent et peuvent aboutir à un état d'inflammation. Une perte de la tolérance immunitaire face au microbiote intestinal, avec notamment la prolifération de cellules mononucléaires de la lamina propria associée à une expansion des lymphocytes TCD8+, a été documentée chez les patients atteints de MICI active⁷⁸.

- ✚ En cinquième lieu, la majorité des polymorphismes génétiques de susceptibilité aux MICI sont associés à la fonction de barrière de la muqueuse de l'hôte et impliquent des interactions hôte-microbiote⁸¹ (voir aussi chapitre 2).
- ✚ En sixième point, il a été montré qu'une déplétion des bactéries commensales peut entraîner une altération de la cicatrisation de la muqueuse, une inflammation chronique et une colite⁸¹.
- ✚ En dernier lieu, des arguments cliniques suspectent le rôle du microbiote dans la récurrence après résection iléale. L'équipe de Rutgeerts a montré qu'après résection de l'iléon terminal dans la MC, la récurrence survenait chez 70% des malades dans les 6 mois suivant le rétablissement de la continuité digestive, et ne s'observait pas chez les patients ayant une iléostomie. Après résection iléo-caecale, le néo-iléon terminal est exposé à la flore microbienne colique reconnue comme étrangère, ce qui induit une réponse immunitaire⁸².

Le microbiote semble donc impliqué dans les MICI. De nombreuses études ont d'ailleurs reporté l'existence d'un déséquilibre de la flore intestinale chez les patients MICI, portant le nom de dysbiose^{45,83,84,77}.

7. Dysbiose :

Chez les patients atteints de MICI, la dysbiose, délétère en elle-même, peut permettre l'émergence de microorganismes potentiellement pathogènes et pro-inflammatoires. Plusieurs agents ont été incriminés dans la MC: *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium* sous-espèce *paratuberculosis* (MAP), *Bacteroides fragilis* produisant une entérotoxine⁴⁶, *Fusobacterium varium*⁸⁵ et *Escherichia coli* (*E. coli*)⁴⁶. Parmi les *E. coli*, un pathovar^{bb} spécifique émerge, il s'agit de l'*E. coli* adhérent et invasif (adherent invasive *E. coli*).

^b Le pathovar correspond à une classification bactérienne renfermant des propriétés pathologiques.

La dysbiose est considérée comme des changements dans la composition et la diversité du microbiote ainsi qu'une altération de sa fonction⁷⁸, capable de provoquer / conduire à une perturbation de l'homéostasie « microbes-hôtes » et qui déclencherait ou aggraverait les MICI⁸⁶. Chez les patients atteints de MICI, il a été reporté un déséquilibre entre la quantité de bactéries dites «protectrices » (*Bifidobacteries, Lactobacillus*) et de bactéries dites «délétères » (*Bacteroides, E. coli, Enterobacter*)^{45,85} (Figure 13).

Dans cette partie, la recherche bibliographique ciblera surtout sur l'étude plus approfondie d'un groupe de bactérie, le pathovar *E. coli* adhérent et invasif dénommé aussi AIEC. Le pathovar AIEC, représentant la principale thématique de recherche dans le cadre de ma thèse, fera l'objet d'un troisième chapitre.

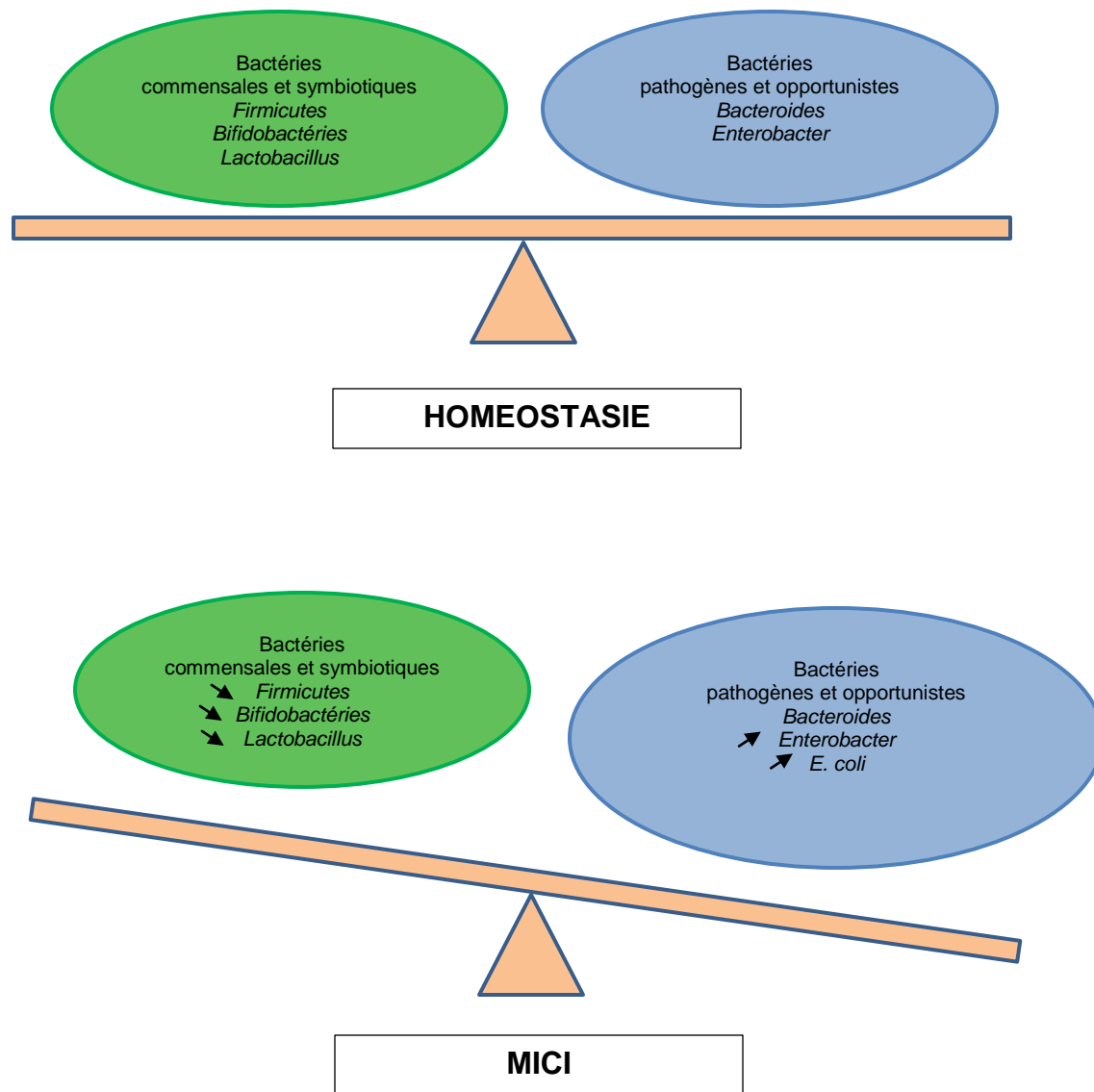


Figure 13: Représentation schématique de la dysbiose intestinale⁴⁵.

CHAPITRE 3 : LE PATHOVAR *E. coli* ADHERENT ET INVASIF (AIEC) ET SON IMPLICATION DANS LES MICI ?

I. *E. coli* et MICI :

1. Etude de la proportion des *E. coli* dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MICI:

Sur de nombreuses études indépendantes, de fortes concentrations d'*E. coli* ont été reportées chez les patients atteints de la MC en comparaison à des contrôles, par technique qPCR^{87,88,89,90}. Les différences sont particulièrement significatives chez les patients présentant une MC à localisation iléale, sans aucune significativité chez les patients présentant une MC colique ou iléocolique. En moyenne, les copies du gène de l'ARNr 16S de la flore *E. coli* représentent 14% et 33% des copies de gènes de l'ARNr 16S de la flore totale respectivement chez les sujets sains et chez les patients atteints de MC iléale (P <0,001). Quant aux patients atteints de RCH, les résultats de quantification des *E. coli* restent controversés⁹¹.

2. Recherche de corrélation entre l'activité de la MICI et la quantité des *E. coli* :

Une abondance d'*E. coli* a été observée plus souvent chez les patients présentant une MC en phase active que chez les patients en période de rémission. En outre, une première étude basée sur l'hybridation fluorescente in situ (FISH) a démontré une augmentation du nombre d'*E. coli* dans l'épithélium et dans la lamina propria chez les patients MC en phase active de maladie par rapport aux patients MC en rémission. Ces résultats semblent être en accord avec les données d'une seconde étude reportant une forte quantité d'*E. coli* isolés de l'iléon néoterminal des patients MC et associée à une récurrence précoce de la maladie⁹¹.

3. Caractéristiques pathogéniques des souches *E. coli* de patients atteints de MICI :

Les souches d'*E. coli* de patients atteints de MICI sont hétérogènes et appartiennent à différents sérotypes. Des études ont souligné une colonisation plus importante par des souches *E. coli* appartenant aux phylogroupes B2 et D chez les patients atteints de MICI en comparaison à des sujets sains^{92,93}. Toutefois, d'autres études semblent montrer une répartition similaire des phylogroupes entre les souches de patients MICI et de témoins^{94,95}. Ces contradictions peuvent s'expliquer par le type d'échantillon analysé, il a ainsi été reporté que chez des individus sains, les *E. coli* transitoires (plus susceptibles d'être trouvés dans les fèces) appartiennent principalement aux phylogroupes A et B1, tandis que les *E. coli* résidents (plus susceptibles de se trouver au niveau de la muqueuse) appartiennent aux phylogroupes B2 et D. Un autre facteur pouvant influencer la distribution des phylogroupes dans les MICI est la sévérité de la maladie. Chez les patients atteints de MICI, une proportion importante d'isolats B2 et D a été retrouvée chez des patients MICI en phase de poussée de la maladie. Cela dénote un changement des populations d'*E. coli* vers des isolats qui s'adaptent mieux au tissu enflammé et / ou des isolats qui seraient impliqués dans l'inflammation⁹¹.

Les souches *E. coli* ont fait l'objet d'études approfondies chez les patients atteints de MICI avec notamment la découverte d'un nouveau pathovar dénommé *E. coli* invasif adhérent (AIEC) et fortement incriminé dans les MICI. Il a en effet été rapporté que les patients atteints de MICI présentent une colonisation anormale des AIEC au niveau de la muqueuse iléale. Environ 38% des patients atteints de MC à localisation iléale active sont colonisés par les AIEC tandis que les témoins sains et les patients atteints de MC à localisation colique présentent un pourcentage très faible de ces pathovars⁹⁶. Les AIEC ont été décrits depuis plusieurs années, des progrès substantiels ont été effectués concernant les mécanismes de pathogénicité de ces pathovars. Néanmoins, les bases moléculaires qui caractérisent les propriétés phénotypiques de ces pathovars ne sont pas toujours résolues⁹¹.

II. Définition de l'AIEC :

Le pathovar AIEC, contrairement aux *E. coli* appartenant à la flore commensale, correspond à un *E. coli* ayant acquis des facteurs spécifiques de virulence et d'invasion. La pathogénèse des AIEC implique notamment une survie et réplication dans les cellules épithéliales intestinales et dans les macrophages, *in vitro* et *in vivo*, entraînant ainsi une perturbation de la barrière intestinale⁹⁷. Le phénotype AIEC est associé à leur i) abilité à adhérer aux cellules épithéliales intestinales, ii) leur capacité à envahir les cellules épithéliales intestinales, iii) leur capacité à survivre et se répliquer dans les macrophages sans induction de l'apoptose, et iv) leur absence de déterminants invasifs spécifiques connus⁹⁸.

III. Mécanismes utilisés par le pathovar AIEC dans le contexte inflammatoire :

1. Différents mécanismes utilisés par le pathovar AIEC dans le contexte des MICI :

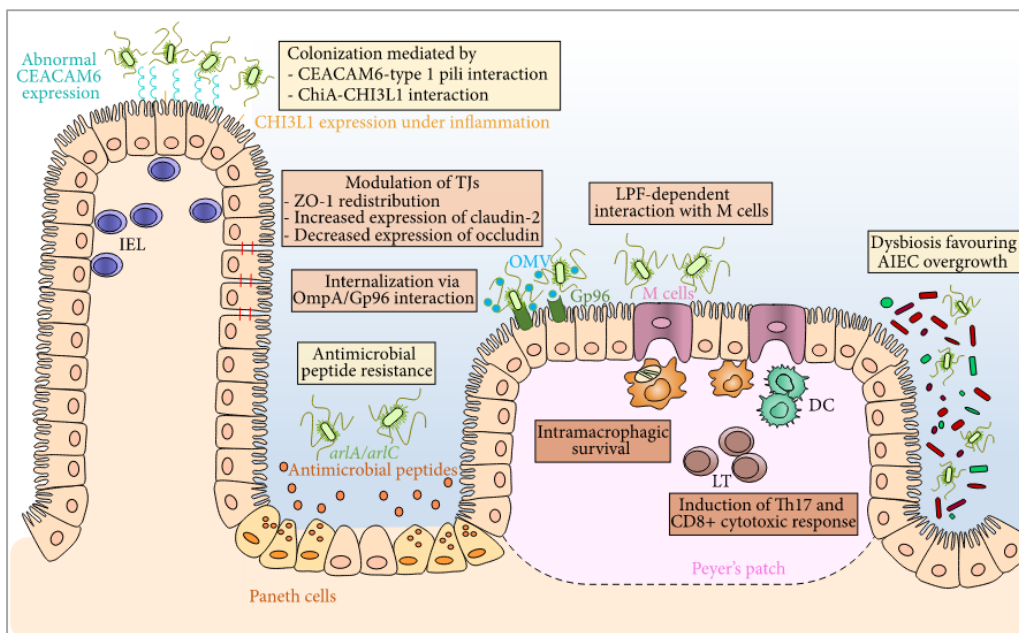
Le pathovar AIEC utilise différentes stratégies pour déclencher et/ou exacerber l'inflammation intestinale (Figure 14).

(1) Le pathovar AIEC peut adhérer fortement aux cellules épithéliales intestinales et coloniser la muqueuse intestinale en utilisant les pili de type 1 qui se lient aux résidus mannose du récepteur carcinoembryonique antigène lié à la cellule d'adhésion moléculaire 6 (CEACAM6), qui est surexprimé sur la surface apicale des cellules épithéliales iléales chez les patients atteints de MC à localisation iléale. L'AIEC peut également adhérer au récepteur de la chitinase 3-like-1 (CHI3L1) via le domaine de liaison à la chitine de la protéine bactérienne ChiA. L'AIEC résiste activement aux peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules de Paneth. Ce mécanisme implique deux principaux gènes, *arlA*, qui code pour une protéine de la famille Mig-14 impliquée dans la résistance aux défensines, et *arlC*, une protéase de la membrane externe de la famille OmpT⁹⁹.

(2) La translocation du pathovar AIEC à travers la barrière épithéliale intestinale est augmentée à la suite de différents mécanismes conduisant à une exacerbation de

l'inflammation intestinale. La modulation des jonctions cellulaires par le pathovar AIEC induit une perméabilité de la barrière paracellulaire impliquant notamment une diminution de l'expression de l'occludine. La glycoprotéine Gp96, surexprimée à la membrane apicale des cellules épithéliales iléales chez les patients atteints de la MC, agit comme un récepteur hôte pour les vésicules membranaires externes du pathovar AIEC portant une protéine OmpA favorisant l'invasion de la muqueuse intestinale. Les bactéries AIEC interagissent avec les plaques de Peyer, transloquent à travers les cellules M via l'expression des long polar fimbriae (LPF) pour accéder aux cellules lymphoïdes⁹⁹.

(3) La réplication intramacrophagique du pathovar AIEC est favorisée dans le compartiment sous muqueux de la cellule hôte. La survie intramacrophagique des AIEC pourrait être due à des défauts d'autophagie de l'hôte conduisant à une réplication bactérienne accrue et favorisant les réponses inflammatoires. L'AIEC peut également induire des réponses cytotoxiques Th17 et CD8+⁹⁹.



Légende :
 IEL : Lymphocytes intra-épithéliaux
 LT : Lymphocyte T
 CD : Cellule dendritique
 TJ : Jonctions serrées

Figure 14 : Stratégies utilisées par l'AIEC pour exacerber l'inflammation intestinale⁹⁹.

2. Facteurs de virulence du pathovar AIEC :

Les souches AIEC portent différents facteurs de virulence tels que les flagelles, les fimbriae de type 1, les protéines de membrane externe et les vésicules membranaires externes, leur conférant ainsi la capacité à adhérer, envahir, survivre et se répliquer à l'intérieur des cellules hôtes¹⁰⁰ (Tableau 2), résultant ainsi en un dysfonctionnement de la barrière épithéliale intestinale et en des réponses pro-inflammatoires médiées par différentes voies de signalisations et pouvant conduire aux MICI (voir chapitre 2).

TABLEAU 2 : Principaux gènes de virulence associés aux souches AIEC isolées de patients atteints de la MC¹⁰⁰.

<u>Virulence genes</u>	<u>Gene description</u>
Adhesin :	
<i>fliC</i>	The major flagellin protein
<i>fimH</i>	D-Mannose-specific adhesion, type I fimbriae
<i>lps</i>	Lipopolysaccharides, the major parts of the out membrane
<i>lpf</i>	Long polar fimbriae
<i>papC</i>	Pilus assembly
<i>papG allele II</i>	Gal (α 1-4) Gal-specific pilus tip adhesin molecule; pyelonephritis-associated papG variant
<i>sfa/focDE</i>	S fimbriae and F1C fimbriae
<i>afaBC</i>	Central region of Dr antigen-specific fimbriae
Protectin :	
<i>neuC</i>	K1 capsule
<i>kspMT II</i>	Group II capsular polysaccharide synthesis (e.g., K1, K5, and K12)
Siderophore :	
<i>chuA</i>	Heme iron acquisition
<i>fyuA</i>	Ferric yersiniabactin uptake
<i>irp2</i>	Yersiniabactin
<i>iut</i>	Ferric aerobactin receptor (iron uptake; transport)
Toxin :	
<i>vat</i>	Vacuolating autotransporter toxin
<i>hlyA</i>	α -Hemolysin
<i>cnf I</i>	Cytotoxic necrotizing factor I
<i>cdt</i>	Cytolethal distending toxin
Invasin :	
<i>ibeA</i>	Invasion of brain endothelium

2.1 Les flagelles

Les flagelles ne constituent pas seulement une structure assurant la mobilité des bactéries. Une récente étude a par ailleurs montré qu'une inactivation du gène *fliC* de la

souche bactérienne AIEC de référence LF82 entraîne une diminution de sa capacité d'adhésion, d'invasion et de formation de biofilm respectivement de 50.4, 74, et 59%¹⁰⁰.

2.2 Les fimbriae

Les fimbriae sont des appendices retrouvés chez de nombreuses bactéries à Gram négatif, ils se composent de la sous-unité principale FimA et de trois sous-unités mineures, FimF, FimG et FimH¹⁰⁰. Les pili de type 1 exprimés par les pathovars AIEC interagissent avec le récepteur CEACAM6 surexprimés à la surface des cellules épithéliales iléales chez les patients atteints de la MC (Figure 14). Après interaction entre les pili de type 1 exprimés par les AIEC et le récepteur CEACAM6, les AIEC adhèrent et pénètrent les cellules épithéliales intestinales induisant une réponse inflammatoire. Lorsqu'ils sont phagocytés par les macrophages, les AIEC deviennent plus résistants à la xénophagie et induisent une réponse inflammatoire par la sécrétion de forts taux de cytokines TNF- α pour tumor necrosis factor¹⁰¹ (voir partie III du chapitre 3), entraînant la formation de granulome *in vitro*. Chez les souris transgéniques CEABAC10, exprimant les récepteurs CEACAM humains permettant de mimer l'expression élevée des récepteurs CEACAM6, la souche de référence AIEC LF82 induit le développement de symptômes cliniques sévères de colite, par un mécanisme pili de type 1 dépendant⁹⁹.

Une autre étude souligne également le facteur virulent contribué par les fimbriae exprimés par les pathovars AIEC. Un remplacement de la sous-unité FimH issue de la souche de référence AIEC LF82 par une sous-unité FimH provenant d'une souche *E. coli* commensale entraîne une diminution significative de l'inflammation chez des souris transgéniques CEABAC10¹⁰⁰.

2.3 Le LPS

Le lipopolysaccharide (LPS) est le principal constituant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Le LPS se lie spécifiquement à son récepteur TLR4-MD2, activant les voies de signalisations myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) et TIR-containing adaptator inducing interferon-b (TRIF), aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires¹⁰⁰.

2.4 Les protéines autotransporteuses

Vat est une protéine autotransporteuse à activité sérine protéase, encodée par différents gènes de virulence. Cette protéine, initialement identifiée sur une souche d'*E. coli* d'un poulet septicémique, est également retrouvée sur les pathovars AIEC. Elle est responsable d'une activité mucinolytique, diminuant ainsi la viscosité du mucus et favorisant ainsi l'approche des AIEC vers les cellules hôtes, contribuant ainsi à un mécanisme de virulence¹⁰⁰.

2.5 Autres facteurs de virulence

Récemment, une autre invasine, encodée par le gène *IbeA* a été identifiée sur le pathovar AIEC. Ce gène affecterait l'interaction des AIEC avec les cellules épithéliales intestinales et les macrophages, son absence pourrait entraîner une perturbation des interactions avec le système immunitaire se traduisant par une diminution de la sécrétion d'interféron γ (IFN- γ)¹⁰⁰.

Un lien a pu être établi entre les souches surexprimant le gène de l'hémolysine (*hly*) et des dysfonctionnements de la barrière épithéliale. L' α -hémolysine causant une perte importante de l'intégrité des jonctions serrées sur des monocouches de cellules de type Caco-2¹⁰⁰.

Chez de nombreuses souches AIEC, sont retrouvées des gènes d'absorption du fer et la présence de *chuA* est en corrélation avec la persistance bactérienne dans les macrophages¹⁰⁰.

IV. Méthodologie d'identification de l'AIEC :

A ce jour, l'évaluation de l'interaction entre la cellule bactérienne et les cellules hôtes constitue la seule méthodologie d'identification des souches *E. coli* invasives⁹⁸.

Le pathovar AIEC est ainsi identifié par des caractéristiques phénotypiques parce qu'il n'existe aucun gène spécifique de virulence pour caractériser l'ensemble des souches ayant des caractéristiques d'invasion^{101,91}. En outre, bien que de nombreux gènes

virulents soient incriminés dans la pathogénicité des AIEC, l'ensemble de ces gènes a également été retrouvé sur des souches *E. coli* non adhérentes et non invasives. Ces données suggèrent ainsi l'absence d'un ensemble de gènes spécifiques permettant d'expliquer les caractéristiques de ces pathovars⁴¹. Actuellement, l'identification de l'AIEC est basée sur des études *in vitro* avec 1) leur capacité à adhérer et envahir les cellules épithéliales intestinales I-407 se traduisant par un score d'invasion supérieur ou égal à 0.1% par rapport à l'inoculum de départ, 2) leur aptitude à survivre et à se répliquer dans les macrophages J774-A1 (Figure 15), 3) leur absence de déterminants génétiques d'invasion et de virulence des pathovars entéropathogènes^{101,91}.

Différentes études utilisant des approches technologiques tels que l'électrophorèse en champ pulsé, la méthode Multilocus Sequence Typing (MSLT) basée sur le typage génétique, le sérotypage ont montré une grande diversité phylogénétique et au sein du séro groupe des souches AIEC. En effet, les souches AIEC appartiennent à différents phylogroupes B2, A, B1 et D^{98,101}.

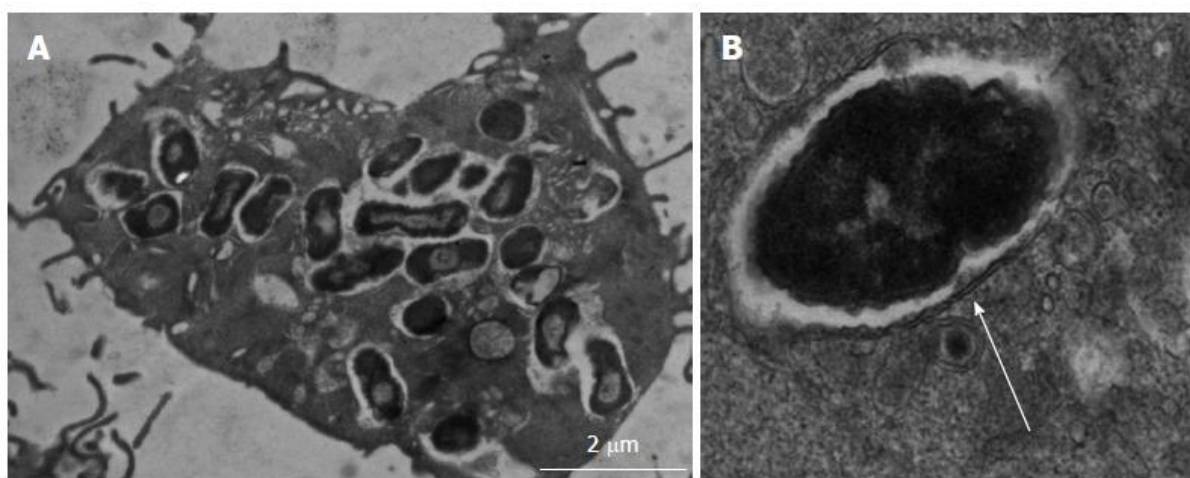


Figure 15 : Microscopie électronique à transmission montrant l'internalisation des AIEC dans les macrophages. A : le pathovar AIEC HM605, isolé au niveau de la muqueuse colique chez un patient atteint de la MC, survit et se réplique dans les vésicules des macrophages murins J774-A1; B: membrane double autour de la vésicule intra-macrophage indiquant que les bactéries sont contenues dans les phagolysosomes⁶².

Des souches d'*E. coli* présentant des déterminants de pathogénicité similaires aux pathovars AIEC ont été associés à d'autres pathologies comme la RCH, le cancer colorectal, la maladie coeliaque mais la prévalence des AIEC dans ces désordres reste inexplorée⁹¹.

V. Prévalence des AIEC dans les MICI vs sujets sains :

Le pathovar AIEC a été largement incriminé dans les MICI et représente l'un des agents bactériens les plus étudiés⁹⁹. Les souches AIEC ont été généralement isolées à partir de tissus, leur localisation exacte dans la muqueuse reste difficile à établir, du fait de l'absence de marqueurs ciblant spécifiquement ces souches d'*E. coli*⁹¹.

La souche AIEC de référence LF82 est la première souche adhérente et invasive isolée chez un patient atteint de la MC au niveau d'une lésion iléale chronique¹⁰¹ et pour laquelle de nombreuses études ont été menées afin de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques de ce pathovar dans les MICI^{102,103,99}.

Le génome complet de cette souche prototype a été étudié, ainsi que celui de 11 autres isolats humains invasifs NRG857c, UM146 et HM605^{98,104}, 541_1, 541_15, 576_1, MS-107-1, MS-115-1, MS-119-7, MS-124-1, MS-145-7¹⁰⁵, isolés de patients atteints de la MC (Tableau 3). Le séquençage de 10 autres souches AIEC isolées au niveau de l'iléon terminal chez 3 patients atteints de la MC, 2 patients atteints de la RCH et 5 patients non MICI, a été établie, sans toutefois permettre l'identification d'un marqueur génétique spécifique. L'une des difficultés associées à la génomique comparative des souches *E. coli* est la forte variabilité inter-souches au niveau du contenu génétique. En outre, le génome d'une souche *E. coli* comprend généralement environ 4500 gènes¹⁰⁶.

TABLEAU 3 : Caractéristiques des 12 souches AIEC isolées de patients MC¹⁰⁵.

E. coli strain	AIEC phenotype	IBD affectation status	Anatomic site	Pathology	Reference
LF82	AIEC	CD	ileum	diseased	[37]
NRG857c	AIEC	CD	ileum	-	[38]
UM146	AIEC	CD	ileum	-	[40]
HM605	AIEC	CD	colon	-	[39]
541_1	AIEC	CD	ileum		[34]
541_15	AIEC	CD	ileum		[34]
576_1	AIEC	CD	ileum		[34]
MS-107-1	AIEC	CD	ileum		
MS-115-1	AIEC	UC	colon	diseased	
MS-119-7	AIEC	CD	colon	-	
MS-124-1	AIEC	CD	ileum	unaffected	
MS-145-7	AIEC	CD	colon	-	

5.1 Prévalence des AIEC chez les patients atteints de la MC :

Le pathovar AIEC semble être isolé plus fréquemment au niveau des biopsies iléales chez les patients atteints de la MC (36.6% contre 6% chez les contrôles). L'équipe de Darfeuille-Michaud et al. a par ailleurs montré que le pathovar AIEC est rarement retrouvé dans le tissu colique, avec 3,7% chez les patients atteints de MC et 1,9% chez les témoins, et aucun dans les échantillons de patients RCH, suggérant ainsi une possible association spécifique du pathovar AIEC avec la MC à localisation iléale^{107,108}.

5.2 Prévalence des AIEC chez les patients atteints de RCH :

La prévalence des AIEC chez les patients atteints de RCH reste peu connue. Bien que de nombreuses études aient montré une forte prévalence de souches adhérentes, très peu se sont penchées sur la présence des AIEC dans le côlon de patients atteints de RCH. La majorité des études a reporté une faible prévalence des AIEC -comparée à celle chez les patients atteints de la MC- estimée à 0% et 10% au niveau de biopsies coliques respectivement chez des adultes et enfants atteints de RCH.

5.3 Prévalence des AIEC chez des sujets sains :

La présence du pathovar AIEC chez des individus sains varie entre 0 à 16% au niveau colique et de 6 à 19% au niveau iléal, suggérant ainsi que ces pathotypes induisent des effets « colitogéniques » seulement en combinaison avec d'autres facteurs associés au MICI tels qu'une susceptibilité génétique et un stimulus environnemental⁸⁰.

La fréquence d'isolement du pathovar AIEC est bien documentée au niveau des prélèvements de biopsies des patients atteints de MICI en comparaison à des sujets ayant subi une colonoscopie et présentant d'autres pathologies. A contrario, très peu d'études sont ciblées sur la détection de ces pathovars AIEC dans les matières fécales des patients atteints de MICI et chez des sujets en bonne santé. D'où l'objectif de ces travaux de recherche.

VI. Questionnement sur les AIEC:

À l'heure actuelle, il est difficile de déterminer si les pathovars AIEC déclenchent une inflammation intestinale, conduisant ainsi à la maladie ou si elles colonisent la muqueuse intestinale à la suite d'un contexte inflammatoire préexistant, auquel cas ils pourraient constituer un facteur aggravant⁹⁹.

6.1 Rôle primaire ou secondaire des AIEC dans les MICI :

Les AIEC sont fréquemment isolés au niveau intestinal chez les patients atteints de la MC. Cependant, ce pathovar est également retrouvé chez les sujets sains sans pour autant engendrer de pathologies particulières. Avec les connaissances actuelles, les bactéries AIEC sont considérées comme un pathogène intestinal capable de favoriser la maladie uniquement dans des contextes génétiques ou environnementaux spécifiques, et portent le nom de pathobionts⁹⁹. Les AIEC exacerberaient ainsi l'inflammation des MICI chez des hôtes prédisposés et immunodéprimés⁹⁸.

Les patients atteints de la MC montrent une immunodéficiences génétique de l'élimination de particules intracellulaires, il est donc possible que ces patients soient dans l'incapacité

d'éliminer les AIEC qui migrent alors dans la lamina propria, engendrant ainsi une inflammation chronique. Ainsi, sous cette hypothèse, les AIEC peuvent être considérés comme acteur principal dans l'initiation de la MC. Cependant, si cette hypothèse semble plausible, une question reste en suspens : comment expliquer que les patients atteints de la MC ne soient pas plus susceptibles à des infections causées par d'autres pathogènes ayant des propriétés d'adhésion et d'invasion tels que *Salmonella* et *Shigella*. Selon Smith et al., la prolifération des AIEC serait secondaire à l'inflammation. Des changements du microbiote intestinal associés à des défauts génétiques stimuleraient les réponses immunologiques résultant en une inflammation qui pourrait, en retour, favoriser la prolifération et l'invasion des AIEC (soit par une régulation des récepteurs CEACAM6 et Gp96 ou soit par induction d'ulcérations qui facilitent la translocation des AIEC au niveau de la lamina propria)⁴¹ (voir partie III du chapitre 3).

6.2 Persistance des AIEC dans les MICI et sujets sains :

Actuellement, il n'existe pas d'études montrant une corrélation ou non entre la présence des AIEC avec le type ou la gravité des MICI¹⁰¹.

Une réponse concernant l'origine de la persistance du pathovar AIEC pourra être proposée à l'avenir avec le suivi des patients atteints de MICI et de sujets témoins tout au long de leur vie via le développement de banques d'échantillons fécaux⁹⁹.

6.3 Réservoir et habitat des AIEC :

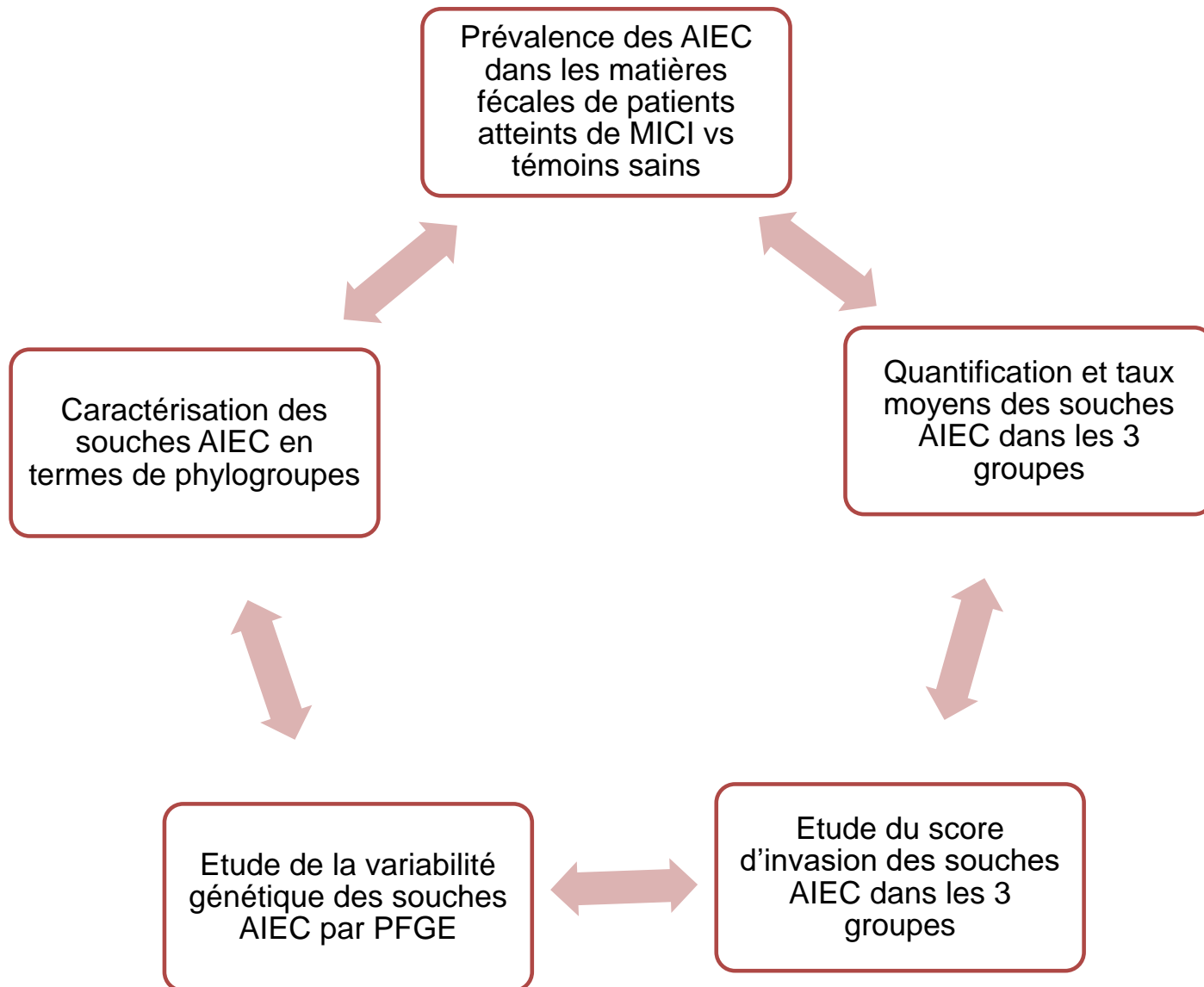
La détection du pathovar AIEC au niveau du tractus intestinal des chats, des chiens, des porcs¹⁰¹ et des chiens boxers atteints de colite granulomateuse¹⁰⁹ apportent un argument en faveur de l'absence de spécificité de l'hôte pour ce pathovar¹⁰¹. La présence d'AIEC dans l'intestin de plusieurs espèces animales suggère un risque de zoonose¹⁰¹.

Ainsi, des études épidémiologiques à plus grande échelle permettraient d'apporter des réponses quant à la distribution, le réservoir et les voies de transmission de ce pathovar⁸⁴.

OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Dans ce mémoire de thèse, la problématique a porté sur la recherche des AIEC dans les matières fécales de patients atteints de MICI vs individus sains. A partir de cette problématique, différentes questions ont été soulevées.

- En premier lieu, la **prévalence** des souches AIEC a été étudiée chez les patients MICI versus individus sains.
- En second lieu, nous nous sommes intéressés à la **quantification et les taux** moyens des AIEC dans les différents groupes.
- La **proportion** des AIEC par rapport à la flore *E. coli* a été investiguée, de même pour les **scores d'invasion** *in vitro* sur les cellules épithéliales intestinales et sur la capacité de ces souches AIEC à survivre et à se répliquer dans les macrophages J774-A1.
- Le **typage** des souches AIEC a été étudié par PFGE, permettant l'analyse de marqueurs moléculaires.
- En dernier lieu, les souches AIEC ont été définies en termes de phylogroupes dans les différents groupes (données en cours d'étude).



Cette étude a été réalisée sur une cohorte de patients atteints de MICI, avec une activité connue de la maladie, sa localisation, ses antécédents chirurgicaux. L'ensemble des patients n'a pas été traité aux ATB au minimum 3 semaines avant l'analyse des matières fécales. Un total de 288 prélèvements de matières fécales fraîches a été recueilli dans notre étude pour la recherche des AIEC, 109 provenant de patients MC, 87 de patients RCH et 92 de témoins sains.

En complément à cette étude et pour compléter les données chez les individus sains, les critères de pathogénicité des AIEC ont été recherchés pour les souches de la collection ECOR isolées pour la majorité d'entre elles des fèces d'individus et d'animaux sains ; cette collection constitue ainsi un outil idéal d'évaluation de la prévalence des AIEC en condition saine. Cette étude a pour finalité de mieux caractériser le portage du pathovar AIEC en condition saine, qu'il soit d'origine humaine ou animale, permettant une meilleure compréhension du réservoir des AIEC, de la niche environnementale potentielle et d'une possible transmission humaine.

PARTIES EXPERIMENTALES

Recherche des AIEC dans les matières fécales des patients atteints de MICI versus témoins sains.

1. Présentation de l'étude :

Dans cette étude, la flore bactérienne a été qualifiée et quantifiée à partir de prélèvements de matières fécales de patients atteints de MICI. Dans ce travail de recherche, le principal objectif a consisté en l'évaluation de la **prévalence des AIEC** dans ces différents groupes. Le but de cette étude est d'approfondir les connaissances sur **la fréquence d'isolement et le taux des AIEC dans les matières fécales** de patients atteints de MICI en comparaison à des individus en bonne santé.

2. Modèle expérimental d'étude :

Prélèvements de matières fécales de :

- Patients atteints de la MC (n=109) ;
- Patients atteints de la RCH (n=87) ;
- Témoins sains (n=92).

La majorité des sujets sains inclus dans cette étude ont été recrutés dans le cadre d'un protocole de recherche clinique.

Les données cliniques (âge, sexe, localisation et activité de la maladie, tabagisme, chirurgie, traitement) restent à être exploitées chez les patients atteints de MICI.

3. Matériel expérimental:

- Prélèvements de matières fécales de patients atteints de MICI et de sujets sains
- Milieu MacConkey
- Milieu Columbia au sang (CS)
- Tubes de dilution de Ringer cystéiné (RC) de 9 ml
- Tubes de bouillon d'enrichissement (BH) de 9 ml
- Milieu Kligler-Hajna
- Milieu citrate

- Milieu viande levure (VL)
- Cellules épithéliales intestinales humaines I-407 (ATCC CCL-6)
- Milieu Basal Medium Eagle (BME) supplémenté en sérum de veau fécal (SVF) (10%) et en glutamine (1%)
- Plaque 24 puits (test quantitatif) et 96 puits (test qualitatif)
- Trypsine/EDTA
- Solution saline tamponnée au phosphate (PBS)
- Triton X100
- Solution de gentamicine à 20 et 100 µg/ml
- Milieu Luria Bertani (LB)
- Macrophages murins J774-A1 (ATCC n° TIB67)
- Milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplémenté en SVF (10%)
- Milieu Mueller Hinton agar (MHA)
- ADN bactérien des isolats *E. coli*
- Gènes associés aux entéropathogènes (*stx-1*, *stx-2*, *ipaC*, *estA*, *elt*, *tia*, *bfpA*, *eae*, *ehxA*, *aggR*, *pCVD432*, *afaD*).

4. Méthodologie:

4.1 Méthode d'isolement des bactéries et dénombrement « quantitatif » à partir des prélèvements de matière fécale des patients atteints de MICI et des sujets sains :

Le but de cette étape est d'isoler, de quantifier et d'analyser la flore entérobactérienne (*E. coli* et autres bacilles à Gram négatif) à partir du milieu MacConkey et du bouillon d'enrichissement BH à la suite de leur inoculation avec les matières fécales. La flore totale cultivable sur le milieu CS incubé en anaérobiose est également étudiée afin de s'assurer de la bonne conservation de l'échantillon durant le transport.

Le protocole d'isolement et de quantification de la flore *E. coli* à partir de prélèvements fécaux de patients et de témoins est le suivant:

Environ 1g de matière fécale est prélevé et introduit dans un tube de 9 mL de RC régénéré. Ce tube correspond à la dilution -1. Le tube est pesé avant et après introduction de la matière fécale afin de connaître la masse exacte du prélèvement. On prélève 1 mL du tube correspondant à la dilution -1 que l'on introduit dans un nouveau tube de RC de 9 mL. On obtient ainsi la dilution -2. On recommence cette opération de façon à obtenir une gamme de dilution jusque -8. Un volume de 100µL de chaque dilution est prélevé et ensemencé dans deux milieux de culture afin de dénombrer la flore entérobactérienne (milieu sélectif MacConkey) et la flore totale cultivable (milieu CS).

Les géloses MacConkey sont mises en incubation à 37°C pendant 24 à 48h sous aérobiose et les géloses CS pendant 7 jours d'incubation en anaérobiose à 37°C.

Des dénombrements et des identifications bactériennes sont ensuite effectués à partir des colonies apparaissant sur les milieux MacConkey et sur CS.

Les résultats des dénombrements bactériens sont exprimés en log unité formant colonie (UFC) /g de matières fécales en appliquant la formule suivante :

$$N = \frac{n \times 10^{d-1} \times (9+P)}{P}$$

Avec : N : dénombrement (en UFC/g de fèces)
n : nombre de colonie (compris entre 15 et 150)
d : numéro de la dilution
P : poids des selles

4.2 Méthode d'identification et dénombrement « qualitatif » de la flore entérobactérienne dont les *E. coli* à partir des géloses MacConkey :

Le but de cette phase est d'analyser qualitativement la flore entérobactérienne, notamment les *E. coli*, à partir des géloses MacConkey. Afin de procéder à l'identification des entérobactéries, trois principaux milieux de culture sont utilisés : le milieu Kligler Hajna, le milieu citrate et le milieu VL.

Systématiquement entre 1 à 10 colonies supposées être des *E. coli* ainsi que tous les autres types de colonies sont repiqués sur milieu Kligler Hajna puis incubé pendant 24 heures à 37°C. Le but de ces 10 repiquages d'*E. coli* par patient est d'évaluer la variabilité des souches AIEC. A partir du milieu Kligler-Hajna, les entérobactéries sont ensemencées sur les milieux citrate et viande levure.

Les souches *E. coli* sont identifiées par les caractères biochimiques suivants :

- Glucose + ; lactose+ ; Gaz+
- Citrate - ; indole +

Les souches ne présentant pas les caractéristiques ci-dessus sont repiquées sur le milieu MHA et identifiées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight).

Les souches identifiées sont congelées en milieu BH, l'identification du pathovar AIEC est menée sur les souches *E. coli* par la réalisation des tests d'invasion sur une lignée cellulaire intestinale humaine I-407, la sensibilité à la gentamicine et l'absence des gènes de virulence associés aux pathotypes entéropathogènes. La détermination de la phylogénétique des AIEC est également recherchée.

En parallèle, afin de baisser le seuil de détection bactérien, environ 1g et 5g de matière fécale est introduit dans un tube BH et flacon BH respectivement. Le tube BH paraffiné et le flacon BH sont incubés à 37°C pendant 24h. Des isollements sur MacConkey sont réalisés après culture bactérienne. Ces enrichissements permettent de descendre le seuil de détection.

4.3 Identification phénotypique du pathovar AIEC à partir des souches E. coli isolées des matières fécales de patients et de témoins:

La caractérisation du pathovar AIEC repose sur 3 points principaux :

- Un score d'invasion des souches *E. coli* supérieur ou égal à 0,1%, score établi par le test d'invasion sur la lignée cellulaire I-407 (peuvent être étudié uniquement les souches sensibles à la gentamicine).
- Une survie et une réplication à l'intérieur des macrophages de la lignée J774.
- L'absence de gènes de virulence associés aux pathotypes entéropathogènes.

Après isolement et identification des souches *E. coli* des prélèvements de matières fécales de patients atteints de MICI et de sujets sains, ces isolats sont caractérisés par leur capacité invasive *in vitro* sur les cellules épithéliales I-407 sans étudier préalablement leur capacité d'adhésion.

4.3.1 Test de culture cellulaire selon la méthode de référence d'identification des souches invasives :

L'intérêt de cette étape est d'étudier la capacité des souches *E. coli* à envahir les cellules épithéliales intestinales évaluée en appliquant la méthode gold standard sur les cellules intestinales humaines I-407.

Un premier test qualitatif est réalisé en plaque 96 puits. Ce test permet de sélectionner les souches à fort potentiel d'invasion et de conclure sur les souches non invasives. Systématiquement, les souches considérées comme potentiellement invasives par ce premier test sont testées quantitativement (Figure 16).

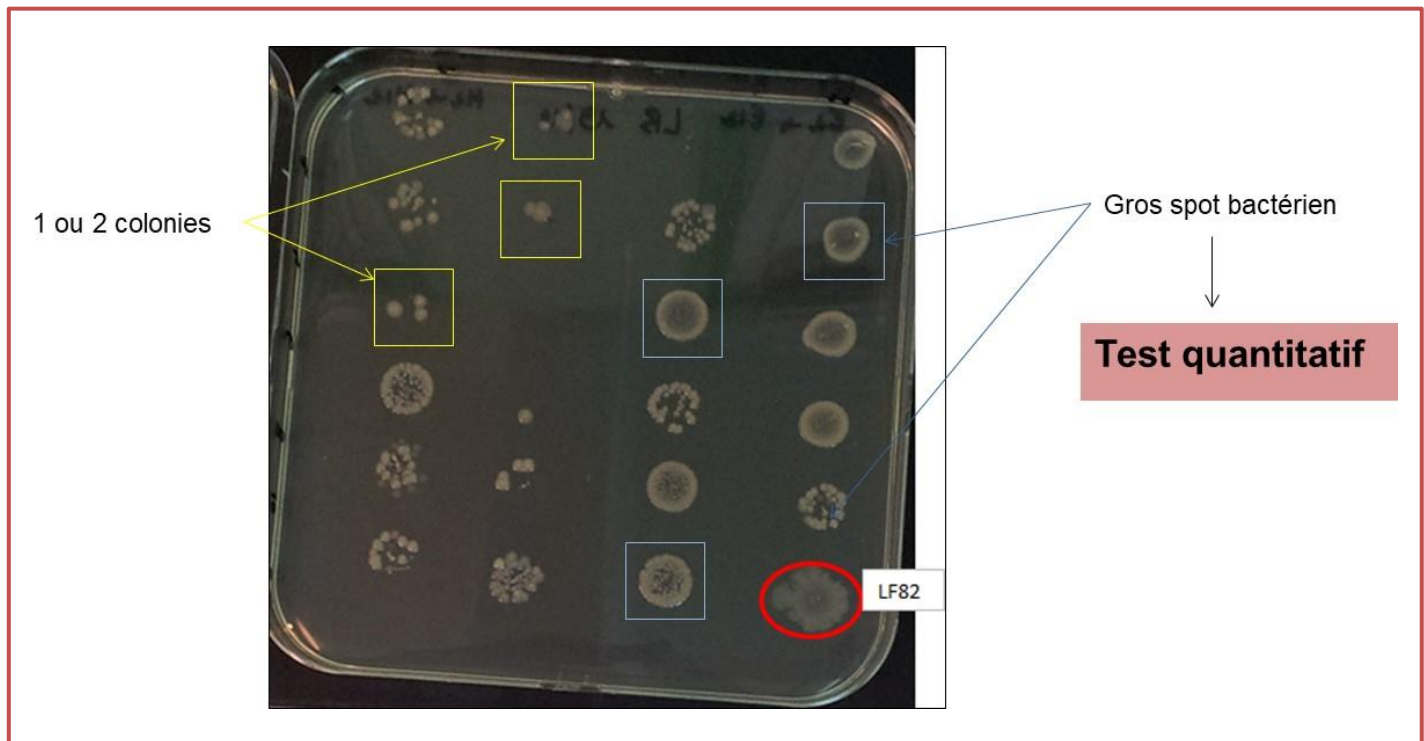


Figure 16 : Exemple d'un résultat qualitatif permettant de sélectionner les souches invasives utilisées dans le test quantitatif.

Le protocole de caractérisation des AIEC se fait sur deux jours : il nécessite pour cela la préparation d'une part des souches bactériennes et d'autre part des cellules I-407.

Préparation des cellules eucaryotes :

A J-1, les cellules I-407 sont décrochées de la flasque et sont déposées sur une plaque de 96 puits ou 24 puits à une concentration finale fixe de $1 \cdot 10^5$ ou de $4 \cdot 10^5$ cellules/puits respectivement pour le test qualitatif et le test quantitatif. A partir de la flasque renfermant les cellules adhérentes confluentes, le milieu de culture est aspiré, puis les cellules sont rincées par 15 mL de PBS. Les cellules sont ensuite décrochées de la flasque par ajout de 5 mL de trypsine/EDTA et incubées à 37°C sous 5% de CO_2 pendant une minute. Une fois les cellules décrochées du support, elles sont reprises dans 10 mL de milieu de culture BME supplémenté en SVF (10%) et en glutamine (1%). Les cellules sont dénombrées par comptage cellulaire sur une cellule de Thoma afin de disposer d'une concentration cellulaire fixe de $1 \cdot 10^5$ ou $4 \cdot 10^5$ cellules selon le type de test. La plaque est mise en

incubation à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 20-24h afin de permettre aux cellules d'adhérer au support.

Préparation des souches bactériennes :

A J-1, les souches *E. coli* isolées sont ensemencées en milieu LB (incubation 24h à 37°C). **A T0**, les souches *E. coli* sont relancées en LB par une dilution 1/5^{ème} pour qu'elles soient en phase exponentielle (2h incubation à 37°C). Les souches sont ensuite diluées au 1/100^{ème} dans le milieu de culture cellulaire et les cellules sont ensuite infectées par 100µl ou 1 mL de suspension bactérienne à une multiplicité d'infection de 10 selon le type de test qualitatif et quantitatif respectivement. La plaque est mise en incubation pendant 3h sous 5% CO₂.

En parallèle, des dénombrements de ces suspensions bactériennes sur gélose LB sont réalisés afin de connaître la concentration bactérienne exacte utilisée pour l'infection des cellules (T0).

3 heures après l'infection des cellules (T3), le milieu de culture est retiré puis on procède à des lavages par 200 µl (test qualitatif) ou 1000µL (test quantitatif) de PBS. Un volume de 100µl (test qualitatif) ou 1000µL (test quantitatif) de gentamicine (100µg/ml) est ensuite distribué dans chaque puits. Cet antibiotique est laissé en contact avec les cellules pendant une heure à l'étuve à 37°C sous 5% de CO₂ afin d'éliminer les bactéries extracellulaires. La dernière étape consiste à rincer par du PBS afin d'éliminer la gentamicine du milieu, puis les cellules sont lysées par 100µl et 1000µL de Triton X100 1% respectivement pour les tests qualitatif et quantitatif afin de libérer les bactéries intracellulaires. Pour leur quantification (test quantitatif), des dénombrements bactériens de chaque puits sont réalisés sur gélose LB (T3). Pour le test qualitatif, un volume de 10µl de chacun des puits est déposé sur la gélose LB. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

La souche *E. coli* sera considérée comme invasive lorsque le ratio flore bactérienne intracellulaire à T3 / flore bactérienne extracellulaire à T0 sera supérieure à 0,1%. Un contrôle négatif (*E. coli* K12) et un contrôle positif (LF82) sont systématiquement inclus aussi bien dans les tests qualitatifs que quantitatifs afin de valider la méthodologie.

4.3.2 Test de sensibilité à la gentamicine :

Le but de cette phase est d'évaluer la sensibilité à la gentamicine de l'ensemble des souches *E. coli*. Il est en effet primordial de s'assurer de leur sensibilité à la gentamicine car lors du test d'invasion, cet antibiotique est utilisé afin d'éliminer les bactéries extracellulaires et permettre ainsi uniquement le dénombrement des bactéries intracellulaires.

Le protocole utilisé est le suivant :

Les souches *E. coli* sont repiquées en tubes MHA en pente puis incubées pendant 24 heures à 37°C. A partir de la culture bactérienne, une dilution bactérienne est réalisée afin d'obtenir un inoculum Mc Farland 0,5 (recommandation de l'EUCAST). A partir de cet inoculum, un volume de 0,1 mL est déposé sur les géloses MHA puis étalé. Un disque de gentamicine de 10 µg est déposé au centre de la gélose. Les géloses sont ensuite mises en incubation pendant 24 heures à 37°C.

La lecture s'effectue par lecture des diamètres d'inhibition.

Une souche est résistante si son diamètre est inférieur à 14 mm, au contraire elle est sensible si son diamètre est supérieur ou égal à 17 mm (seuils définis par l'EUCAST)¹¹⁰. Dans ce test, un témoin contrôle (*E. coli* ATCC 25922) est inclu afin de valider le test. Cette souche doit avoir un diamètre d'inhibition compris entre 19 et 26 mm¹¹⁰.

4.3.3 Etude des gènes de virulence associés aux pathotypes entéro-pathogènes :

La recherche de 12 principaux gènes de virulence connus pour être associés à des souches d'*E. coli* entéro-pathogènes (enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), diffuse-adhering *E. coli* (DAEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) (Tableau 4) a été menée sur l'ensemble des souches *E. coli* invasives isolées des patients et des témoins par la réalisation d'une PCR en temps réel. Le but de cette étape est de vérifier l'absence de ces principaux gènes associés aux entéro-pathogènes sur les isolats *E. coli*. Brièvement, l'ADN bactérien est extrait par thermolysat. Après centrifugation, le surnageant est utilisé comme matrice d'ADN pour la PCR en temps réel. Un volume de 10µL des différents

mélanges réactionnels (Eau, amorces sens et anti-sens, SYBR Green) est déposé sur une plaque 96 puits, complété par un volume de 2 μ L des échantillons d'ADN bactérien. Après centrifugation de la plaque, l'amplification des gènes cibles est analysée sur l'automate QuantStudio™3 System, après succession de 40 cycles. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant, permettant de déterminer la présence ou absence des gènes cibles parmi les souches (Tableau 4).

Pour chaque experimentation, des souches *E. coli* de référence appartenant à différents pathovars (ETEC (ATCC 35401), EHEC (ATCC 43895), EPEC (ATCC 43887), EAEC (ATCC 33780), EIEC (ATCC 43893), DAEC (AfaA30)), fournies par le Pr Eric Oswald, IRSD, INSERM UMR 1220, Toulouse, France sont utilisées en tant que contrôle positif.

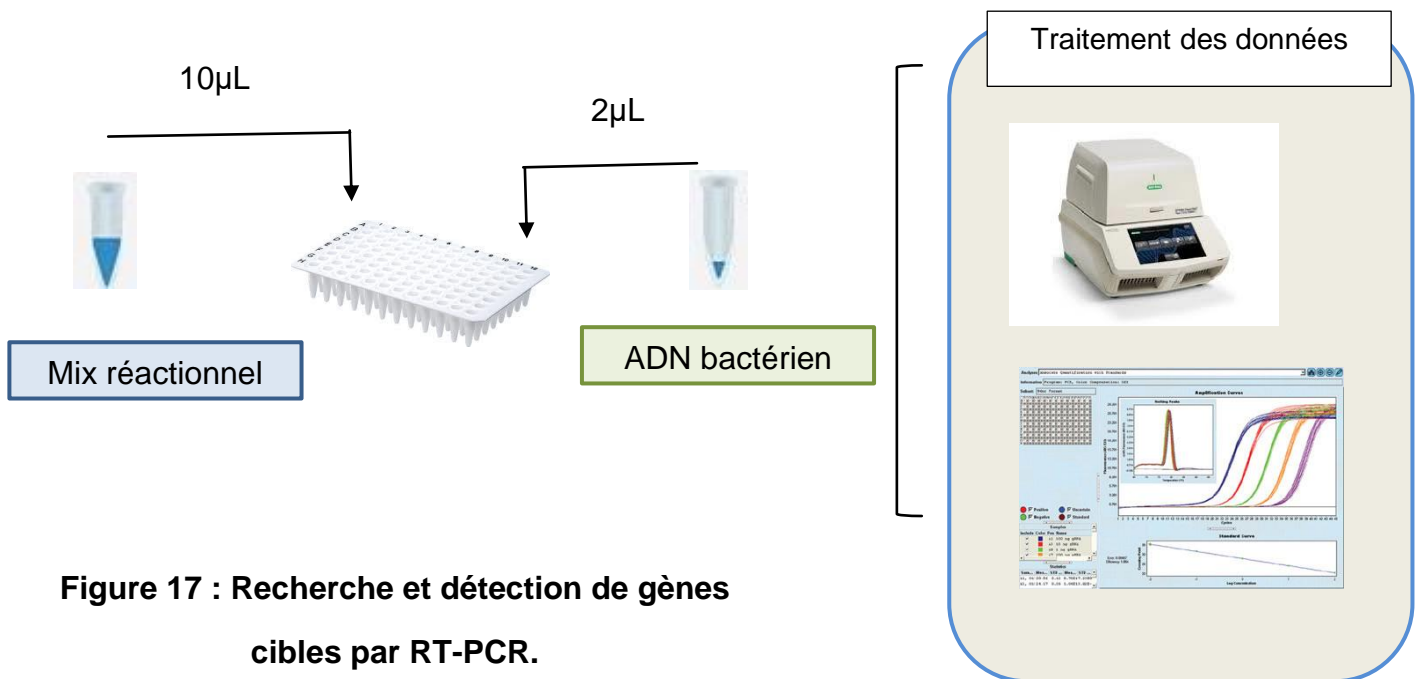


Figure 17 : Recherche et détection de gènes cibles par RT-PCR.

TABLEAU 4 : Primers utilisés pour la détection des gènes de virulence des souches *E. coli* entéropathogènes.

Gènes de virulence	Pathovars	Séquence primer (5'-3')	Produit de PCR (pb)	Références
<i>stx-1</i>	EHEC	Fwd: GCAAAGAMGTATGTWGATTCCG Rev: GWGCCACTATCAATCATCAG	107	111
<i>stx-2</i>		Fwd: AATGCAAATCAGTCGTCAC Rev: TGCATCTCTGGTCATTGTAT	82	111
<i>ipaC</i>	EIEC	Fwd: CCTCACCACAACTAACTCTAGCA Rev: TGCTGCGCAGAAAGGGTATT	175	112
<i>estA</i>	ETEC	Fwd: CACCTTTTCGCTCAGGATGCT Rev: TTCATGCTTTCAGGACTACTTTCATT	115	112
<i>Elt</i>		Fwd: GGYAAAAGAGAAATGGTTAT Rev: TCTCGGTCAGATATGYGATTC	142	111
<i>Tia</i>	ETEC /UPEC	Fwd: GGGTTATGCACGGGTACATCA Rev: GCCAGATTCATTCCAGGAGGTA	61	112
<i>bfpA</i>	EPEC	Fwd: CMGGTGTGATGTTTTACTAC Rev: TGCCCAATATACARACCAT	109	111
<i>Eae</i>	EPEC / EHEC	Fwd: GCTATAACRTCTTCATTGATC Rev: RCTACTTTTTRAAATAGTCTCG	92	111
<i>ehxA</i>		Fwd: GCACCACAACCTTGAYAACT Rev: CCAGATTATTACCTACATTYTCAG	86	111
<i>aggR</i>	EAEC	Fwd: TTTATCGCAATCAGATTAARC Rev: GGACAACRCAAGCATCTAC	94	111
pCVD432		Fwd: AGACTCTGGCGAAAGACTGTATC Rev: ATGGCTGTCTGTAATAGATGAGAAC	194	113
<i>afaD</i>	DAEC	Fwd: CGCACACGGGTTTTTCATGT Rev: CCCCTTCCCGCCTTCT	153	112

4.3.4 *Test de survie et de réplication des souches invasives à l'intérieur des macrophages murins J774-A1:*

L'internalisation des bactéries à l'intérieur des cellules et leur capacité à survivre et à se répliquer à l'intérieur des macrophages ont été déterminées selon la méthode gold standard sur la lignée cellulaire des macrophages murins J774-A1 (ATCC n° TIB67)^{114,115}. Les monocouches de J774-A1, maintenues en milieu DMEM supplémenté en SVF (10%), en L-glutamine (1%), sont ensemencées en plaque 24 puits à une densité de 4×10^5 cellules/mL. Après 20h d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂, les monocouches de cellules sont infectées à une multiplicité d'infection de 100 bactéries par macrophage. Après 10 min de centrifugation à 1000g/min et une période d'incubation de 10 min à 37°C sous 5% de CO₂, les macrophages infectés sont rincés trois fois par du PBS et traités par du milieu de culture cellulaire frais contenant de la gentamicine (100 µg/mL pour le temps 1h post-infection et 20 µg/mL pour le temps 24h post-infection). Après 1h et 24h d'incubation, les bactéries intracellulaires sont quantifiées après rinçage des monocouches cellulaires par du PBS et lyse des cellules par 1 mL de Triton X-100 à 1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). La réplication bactérienne est exprimée par le pourcentage moyen de bactéries dénombrées à 24h post-infection par rapport au nombre de bactéries après 1h de traitement à la gentamicine, défini comme 100%.

4.4 Typage bactérien pour l'étude de la diversité des pathovars AIEC :

Un total de 82 isolats AIEC, détectés chez les patients atteints de la MC et chez les sujets sains, a été caractérisé génétiquement par technique pulse field gel electrophoresis (PFGE). Brièvement, après inclusion des bactéries dans des blocs d'agarose, lyse bactérienne et digestion de l'ADN chromosomal par l'enzyme de restriction XbaI, les fragments d'ADN générés sont séparés par application de champs électriques alternés. Les profils électrophorétiques sont visualisés sur transilluminateur à ultraviolets après coloration du gel par le bromure d'éthidium. A l'issue de l'analyse, des dendrogrammes sont obtenus afin d'évaluer et de comparer le degré de similitude des différentes souches AIEC.

4.5 Détermination de la phylogénétique des souches AIEC chez les patients atteints de MICI vs témoins sains:

Les souches AIEC, identifiées par les méthodologies phénotypiques décrites ci-dessus, sont déterminées pour leur appartenance phylogénétique^{116,117}. 4 principaux gènes (Tableau 5) ont été analysés à partir des extraits ADN bactériens des AIEC afin de déterminer leur groupe phylogénétique (A, B1, B2, ou D).

TABLEAU 5 : Primers utilisés pour la détermination phylogénétique des souches AIEC^{116,117}.

Gènes cibles	Séquence primer (5'-3')	Taille du fragment (pb)	Références
<i>chuA</i>	Fwd : CAGGTGTCCGGTATCCGTTC Rev : GACGAACCAACGGTCAGGAT	101	¹¹⁶
<i>yjaA</i>	Fwd : AGACGCTGCCTTCAGTAACC Rev : TGACAAACCGCCCTCATTCA	175	¹¹⁶
<i>tspE4C2</i>	Fwd : GAGTAATGTCTGGGGCATTCA Rev : CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	¹¹⁶
<i>arpA</i>	Fwd : GTTTGAAGAGATGCACGCCG Rev : ACGCTAAATCTTTGCCTGCG	120	¹¹⁷

L'amplification des 4 principaux gènes cibles est suivie par PCR en temps réel sur les extraits d'ADN bactériens, après validation de contrôles + (souches *E. coli* issues de la

collection ECOR) et de contrôles – (eau). La présence ou absence de gènes permet de classer les souches AIEC en fonction de leur appartenance aux différents phylogroupes (Figure 18).

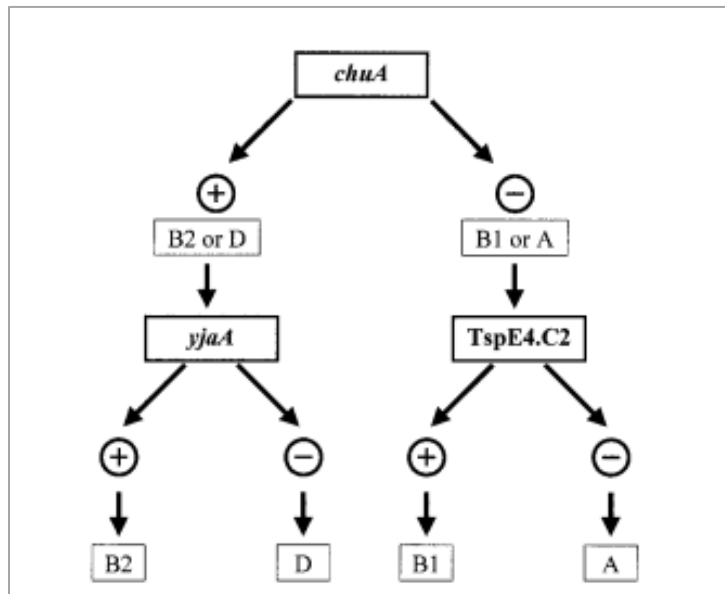


Figure 18 : Détermination du groupe phylogénétique par PCR en temps réel¹¹⁶.

5. Résultats :

La caractérisation du pathovar AIEC repose sur i) leur capacité à adhérer et à envahir les cellules épithéliales intestinales, ii) leur capacité à survivre et à se répliquer à l'intérieur des macrophages sans entraîner de mort cellulaire, iii) l'absence de gènes de virulence associés aux *E. coli* entéropathogènes.

5.1 Quantification d'*E. coli* dans les matières fécales.

La quantification d'*E. coli* a été obtenue sur un total de 288 prélèvements de matières fécales (n=109 MC ; n=87 RCH ; n=92 sujets sains) puis comparée entre les groupes (Figure 19).

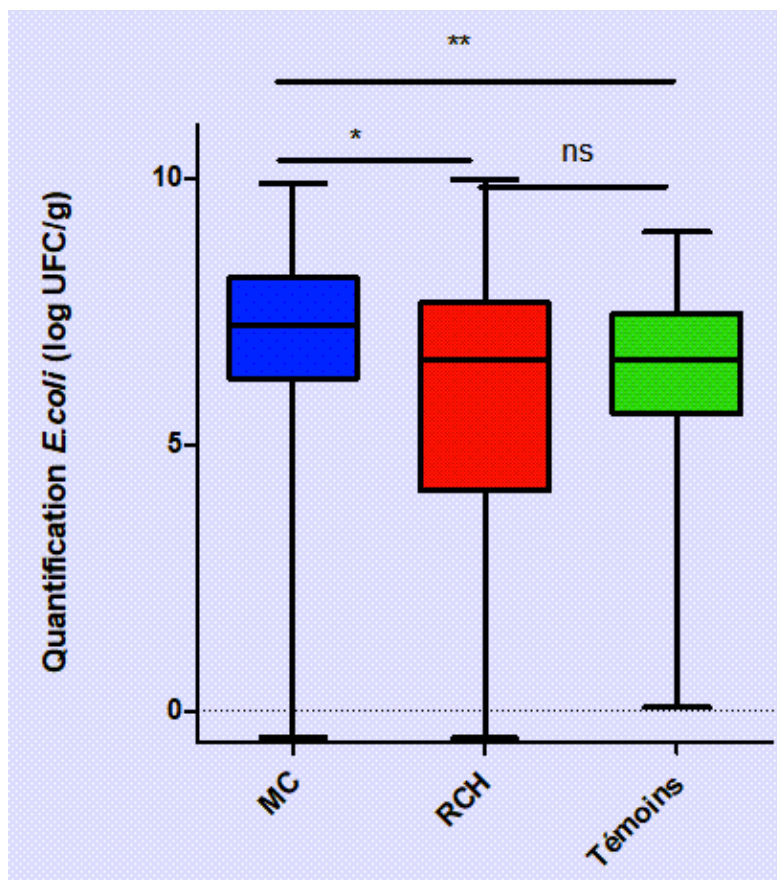


Figure 19 : Quantification de la flore *E. coli* (exprimée en log UFC/g) chez les différents groupes de patients versus témoins sains.

Test statistique appliqué : test de Mann Whitney ; MC vs Témoins** ($p=0,0035$) ; RCH vs Témoins ns ($p=0,7214$) et MC vs RCH* ($p=0,0125$).

La flore *E. coli* est significativement plus élevée chez les patients atteints de la MC (6.83 log UFC/g) en comparaison aux patients atteints de RCH (5.77 log UFC/g) et aux individus sains (6.38 log UFC/g) (Figure 19).

A noter que de larges variations du taux d'*E. coli* (allant de 0 à 10 log UFC/g) ont été reportées chez les 2 groupes de patients et chez les individus sains (Figure 20).

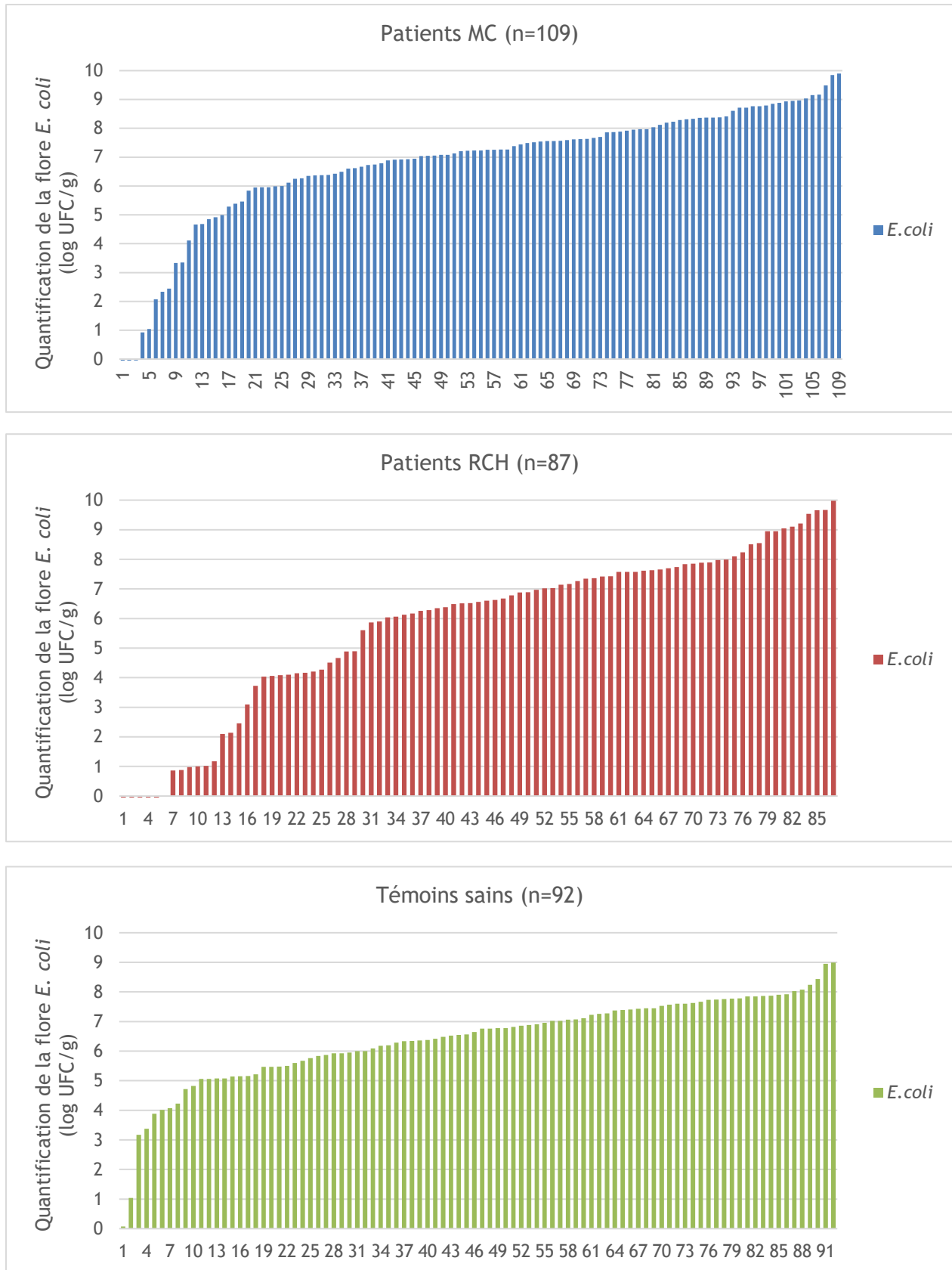


Figure 20 : Variations de la flore E. coli dans les 3 groupes.

Ces résultats nous ont permis de montrer une quantification de la flore *E. coli* significativement plus importante chez les patients atteints de MC en comparaison aux patients atteints de RCH et aux individus sains au niveau luminal, mais qu'en est-il de la prévalence des AIEC chez ces différents groupes de populations?

5.2 Taux et fréquence d'isolement des AIEC dans les différents groupes.

5.2.1 Capacité d'invasion des souches *E. coli* :

Après avoir démontré leur sensibilité à la gentamicine, les souches d'*E. coli* ont été soumises au test d'invasion décrit ci- dessus (voir partie II de la partie expérimentale).

Des souches invasives ont été retrouvées dans les 3 groupes (patients atteints de MC et de RCH et les individus sains) (Tableau 6).

TABLEAU 6 : Etude de l'invasion des souches *E. coli* dans les 3 groupes.

Groupe de patients / individus sains	Total de la population	Patients ou sujets présentant des souches invasives	Taux d'invasion (%)
Patients MC	109	40	0.102% à 9.175%
Patients RCH	87	4	0,166% et 0.354%.
Témoins sains	92	56	0.105% et 5.398%.

Au cours du test d'invasion, une autre caractéristique pathologique inconnue est apparue pour certaines souches à la fois chez les patients atteints de MICI et chez les témoins. Certaines souches ont été capables de détacher les cellules intestinales du support microplaque. Les scores d'invasion de ces souches ne sont pas interprétables, un grand nombre de cellules ont été éliminées aux lavages.

5.2.2 Recherche des gènes de virulence sur les souches *E. coli* invasives :

Toutes les souches fécales précédemment testées comme invasives ont été évaluées pour le génotypage de 12 principaux gènes de virulence associés aux pathotypes d' *E. coli* diarrhéiques, le pathotype EHEC (*stx-1*, *stx-2*, *eae* et *ehxA*), le pathotype EIEC (*ipaC*), le pathotype ETEC (*estA*, *elt* et *tia*), le pathotype EPEC (*eae*, *ehxA*, *bfpA*), le pathotype EAEC (*aggR* et *pCVD432*) et le pathotype DAEC (*afaD*).

Parmi les 40 souches invasives chez les patients atteints de MC, 2 exprimaient le gène de virulence *tia*, ces souches ne peuvent donc pas être considérées comme un AIEC mais comme appartenant au pathotype ETEC/UPEC. Les autres souches étaient négatives pour les gènes testés et peuvent donc être considérées comme un pathotype AIEC.

Dans le cas des patients atteints de RCH, 1 souche invasive était positive pour le gène *eae*, cette souche a été exclue des AIEC au vu de son appartenance au pathotype EPEC/EHEC. Les 3 autres souches invasives étaient en revanche négatives pour les gènes testés, traduisant ainsi leur appartenance au pathovar AIEC.

Parmi les 56 souches invasives provenant des témoins, 2 exprimaient le gène de virulence *tia*, ces souches ne peuvent donc pas être considérées comme un AIEC mais comme appartenant au pathotype ETEC / UPEC. Les autres souches étaient négatives pour les gènes testés et peuvent donc être considérées comme un pathotype AIEC.

5.2.3 Etude de la capacité des souches à survivre et à se répliquer en macrophages :

Les souches *E. coli* révélées invasives et ne présentant pas de gènes associées aux entéropathogènes sont étudiées pour leur capacité à survivre et à se répliquer en macrophages.

TABLEAU 7 : Etude de la capacité des souches *E. coli* invasives et ne présentant pas de gènes associés aux entéropathogènes à survivre et à se répliquer dans les macrophages dans les 3 groupes.

	Souches invasives de patients MC	% moyen de bactéries dénombrées à T24 par rapport au nombre de bactéries à T1h	Souches invasives de patients MC	% moyen de bactéries dénombrées à T24 par rapport au nombre de bactéries à T1h
Souches invasives sans gènes associés aux entéropathogènes chez les patients MC	MC1	193,57±72,74	MC20	369,23±2,56
	MC2	785,99±599,21	MC21	1140,28±132,78
	MC3	152,38±27,89	MC22	527,04±177,04
	MC4	308,88±170,17	MC23	1454,68±615,35
	MC5	1040,52±390,52	MC24	720,15±135,47
	MC6	1024,96±346,01	MC25	300,29±68,24
	MC7	873,69±186,31	MC26	693,12±195,77
	MC8	454,96±50,09	MC27	543,33±123,33
	MC9	420,06±68,83	MC28	509,64±79,64
	MC10	448,82±56,23	MC29	189,22±26,30
	MC11	287,75±173,78	MC30	252,43±41,80
	MC12	499,0±156,5	MC31	280,87±107,54
	MC13	545,4±162,9	MC32	361,88±72,00
	MC14	815,2±105,1	MC33	302,59±43,00
	MC15	948,5±255,8	MC34	20,25±20,12
	MC16	503,49±96,51	MC35	33,80±28,35
	MC17	254,70±45,30	MC36	770,28±410,07
	MC18	823,51±112,85	MC37	614,51±92,62
	MC19	135,56±43,77	MC38	302,03±79,19
Souches non invasives	<i>E. coli</i> K12	66,74±32,90	<i>E. coli</i> Nissle	56,19±29,68
Souche invasive	AIEC LF82	211,12±70,79		

	Souches invasives de patients RCH	% moyen de bactéries dénombrées à T24 par rapport au nombre de bactéries à T1h
Souches invasives sans gènes associés aux entéropathogènes chez les patients RCH	RCH1	378,27±38,74
	RCH2	41,88±8,53
	RCH3	479,39±107,71
Souches non invasives	<i>E. coli</i> K12	66,74±32,90
	<i>E. coli</i> Nissle	56,19±29,68
Souche invasive	AIEC LF82	211,12±70,79

	Souches invasives de sujets sains	% moyen de bactéries dénombrées à T24 par rapport au nombre de bactéries à T1h	Souches invasives de sujets sains	% moyen de bactéries dénombrées à T24 par rapport au nombre de bactéries à T1h
Souches invasives sans gènes associés aux entéropathogènes chez les sujets sains	Témoin 1	1408,49±825,16	Témoin 28	410,85±103,44
	Témoin 2	240,68±28,55	Témoin 29	104,74±3,37
	Témoin 3	534,63±47,46	Témoin 30	613,66±25,09
	Témoin 4	302,94±8,74	Témoin 31	1348,30±774,77
	Témoin 5	1365,79±400,88	Témoin 32	1169,05±542,06
	Témoin 6	207,9±61,31	Témoin 33	1541,59±431,83
	Témoin 7	365,7±247,80	Témoin 34	465,14±294,86
	Témoin 8	490,9±300,43	Témoin 35	535,49±30,94
	Témoin 9	383,3±267,36	Témoin 36	595,59±18,21
	Témoin 10	130,0±48,64	Témoin 37	608,33±258,33
	Témoin 11	32,31±3,69	Témoin 38	663,79±163,79
	Témoin 12	1120,58±593,70	Témoin 39	48,60±12,69
	Témoin 13	6317,99±3682,01	Témoin 40	18,29±0,73
	Témoin 14	663,41±263,41	Témoin 41	353,66±238,58
	Témoin 15	256,50±31,50	Témoin 42	109,50±53,58
	Témoin 16	27,91±1,59	Témoin 43	102,11±40,20
	Témoin 17	1194,38±51,52	Témoin 44	8,29±3,06
	Témoin 18	990,49±401,10	Témoin 45	121,91±26,73
	Témoin 19	1499,13±653,41	Témoin 46	350,49±16,95
	Témoin 20	898,00±78,00	Témoin 47	693,57±45,57
	Témoin 21	527,04±177,04	Témoin 48	161,87±0,10
	Témoin 22	117,43±6,04	Témoin 49	629,99±262,87
	Témoin 23	555,18±98,66	Témoin 50	212,16±21,62
	Témoin 24	529,78±31,62	Témoin 51	53,29±8,37
	Témoin 25	1408,35±753,81	Témoin 52	210,15±9,88
	Témoin 26	1106,49±386,73	Témoin 53	81,67±18,95
	Témoin 27	151,09±69,17	Témoin 54	241,00±4,11
Souches non invasives	<i>E. coli</i> K12	66,74±32,90	<i>E. coli</i> Nissle	56,19±29,68
Souche invasive	AIEC LF82	211,12±70,79		

Chez les patients MC, sur les 38 souches *E. coli* invasives et ne présentant pas de gènes associés aux entéropathogènes, 36 sont capables de survivre et de se répliquer à l'intérieur des macrophages.

Chez les patients atteints de RCH, sur les 3 souches *E. coli* invasives et ne présentant pas de gènes associés aux entéropathogènes, 2 se sont révélées capables de survivre et de se répliquer à l'intérieur des macrophages.

Sur les 54 souches *E. coli* invasives et négatifs aux gènes associés aux entéropathogènes, 47 sont capables de survivre et de se répliquer à l'intérieur des macrophages (Tableau 7).

5.2.4 Prévalence des AIEC dans les différents groupes :

La prévalence des AIEC a été analysée à partir des prélèvements de matières fécales dans les 3 groupes (Figure 21).

Sur les 109 prélèvements fécaux de patients atteints de MC, 36 sont positifs aux AIEC. La fréquence d'isolement des AIEC est estimée à **33%**.

Sur les 87 prélèvements fécaux de patients atteints de RCH, 2 sont positifs aux AIEC. La fréquence d'isolement des AIEC est estimée à **2%**.

Enfin, sur les 92 prélèvements fécaux de témoins sains, 47 sont positifs aux AIEC. La fréquence d'isolement des AIEC est estimée à **51%**.

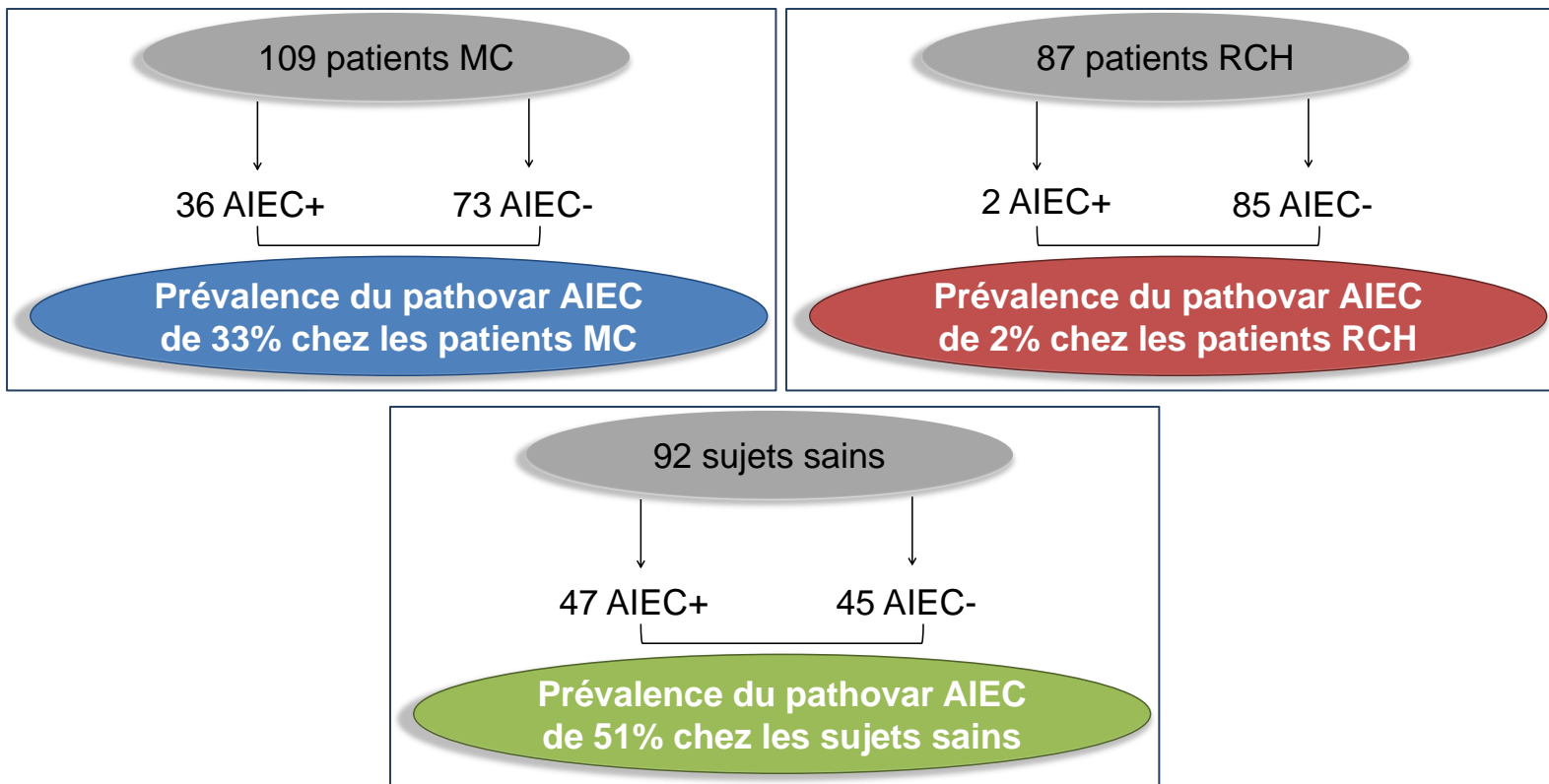


Figure 21 : Prévalence des AIEC chez les différents groupes.

Ces résultats ont donc permis de montrer pour la première fois une fréquence d'isolement de souches AIEC qui est plus importante chez les sujets sains que chez les patients atteints de MICI au niveau luminal.

5.2.5 Taux moyen des AIEC dans les 3 groupes :

Une quantification moyenne du pathovar AIEC (exprimée en log UFC/g) a été investiguée dans les différents groupes de patients et témoins (Figure 22).

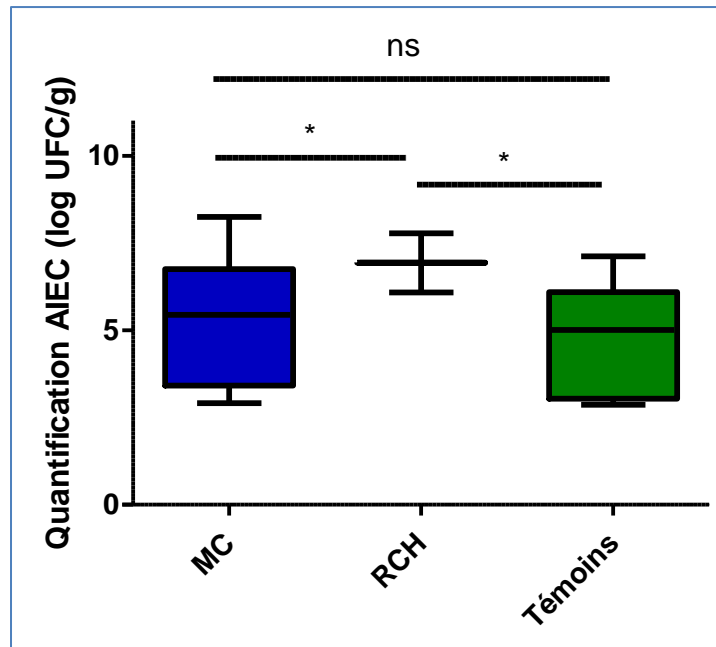


Figure 22 : Quantification des AIEC chez les patients atteints de MICI en comparaison aux individus sains.

Test statistique appliqué : test de Mann Whitney ; MC vs Témoins ns ($p=0,3860$) ; RCH vs Témoins* ($p=0,0140$) et MC vs RCH* ($p=0,0338$).

La quantité moyenne des AIEC est respectivement de 5.2 log UFC/g, de 6.9 log UFC/g et de 4.8 log UFC/g chez les patients atteints de MC ($n=36$), les patients atteints de RCH ($n=2$) et chez les individus sains ($n=47$). Elle est significativement plus élevée chez les patients atteints de RCH que chez les témoins, probablement dû à l'homogénéité des valeurs chez ce groupe de patients (Figure 22).

5.2.6 Proportion des AIEC parmi les E. coli :

Le ratio des AIEC par rapport à la flore *E. coli* a été étudié chez les différents groupes (Figure 23).

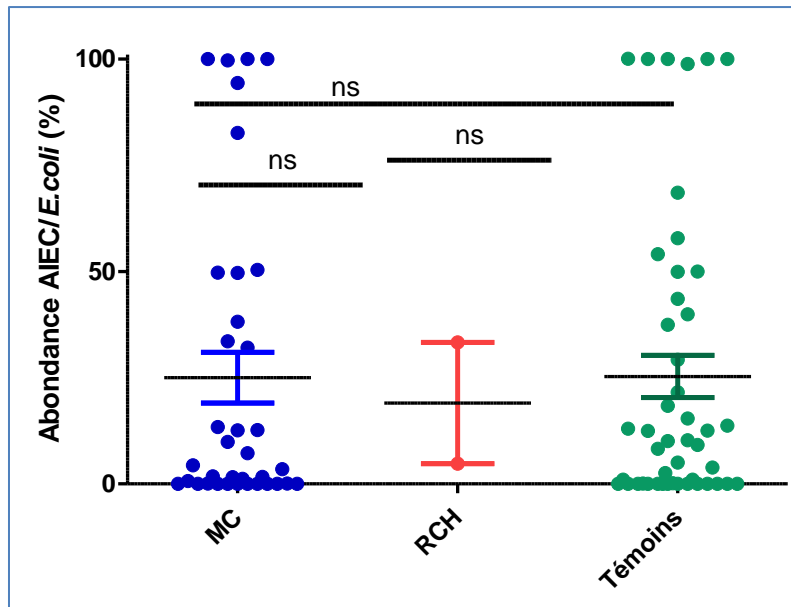


Figure 23 : Etude de la proportion des souches AIEC par rapport à la flore *E. coli* dans les différents groupes de populations.

Test statistique appliqué : test de Mann Whitney ; MC vs Témoins ns ($p=0,9639$) ; RCH vs Témoins ns ($p=0,4824$) et MC vs RCH ns ($p=0,6164$).

Dans les 3 groupes, les souches AIEC, lorsqu'elles sont présentes, peuvent être en dominance ou en sous-dominance par rapport à la flore *E. coli*. Ces souches représentent en moyenne 25% chez les patients MC, 19% chez les patients RCH et 25% chez les témoins sains, sans différence significative notable (Figure 23).

5.2.7 Etude de la détection des AIEC dans les 3 groupes:

Dans notre étude, entre 1 à 10 colonies *E. coli* ont été systématiquement isolées par échantillon. En moyenne, sur les 745 souches *E. coli* isolées chez les patients atteints de la MC, 108 souches ont été identifiées comme appartenant au pathovar AIEC, soit sa détection dans 1/7 des cas. Chez les patients RCH, le pathovar AIEC a été détecté dans 1% des cas (sur un nombre total de 722 souches *E. coli*, 8 présentent des propriétés d'invasion). Chez les sujets sains, sur un total de 475 souches *E. coli*, 90 souches

présentent les caractéristiques du pathovar AIEC, soit une détection similaire que chez les patients atteints de la MC, dans 1/5 des cas (Tableau 8).

TABLEAU 8 : Résumé de l'isolement des souches AIEC dans les 3 groupes.

Patients MC

	Patients MC			Patients MC			Patients MC				
	Nombre d'échantillon	Nombre de souches testées	Nombre souches AIEC +	Nombre d'échantillon	Nombre de souches testées	Nombre souches AIEC +	Nombre d'échantillon	Nombre de souches testées	Nombre souches AIEC +		
1	C43	1	1	37	C101	3	0	73	OR 44	10	1
2	C44	7	5	38	C130	3	0	74	OR 46	10	0
3	C45	7	2	39	C132	3	0	75	OR 47	10	0
4	C46	5	3	40	C187	6	3	76	OR 48	10	0
5	C50	1	1	41	C190	8	8	77	OR 50	10	0
6	C53	2	0	42	C203	7	2	78	OR 51	10	0
7	C66	9	1	43	C204	6	1	79	OR52	0	0
8	C70	3	0	44	C205	8	2	80	OR 56	10	0
9	C71	4	3	45	C206	5	0	81	OR 57	10	0
10	C82	3	2	46	C214	10	0	82	OR 58	10	0
11	C100	1	1	47	C215	11	11	83	OR 59	10	0
12	C112	4	2	48	C216	6	0	84	OR 60	10	0
13	C116	3	0	49	OR1	10	0	85	OR 62	10	0
14	C121	1	1	50	OR4	10	6	86	OR 64	10	0
15	C125	2	0	51	OR 7	10	0	87	OR 65	10	0
16	C137	2	0	52	OR 8	10	0	88	OR 69	10	0
17	C152	5	0	53	OR 9	10	8	89	OR 71	10	7
18	C55	5	3	54	OR 10	10	2	90	OR 73	10	0
19	C57	1	0	55	OR 12	10	0	91	OR 75	10	0
20	C60	3	2	56	OR 13	4	0	92	OR 77	10	0
21	C231	3	3	57	OR 14	3	0	93	OR 79	10	0
22	C233	4	4	58	OR 15	10	0	94	OR 80	10	0
23	C4	1	1	59	OR 17	10	0	95	OR 81	10	0
24	C25	5	0	60	OR 18	10	0	96	OR 85	10	1
25	C32	4	0	61	OR 22	9	0	97	OR 86	10	0
26	C34	4	2	62	OR 23	10	0	98	OR87	10	0
27	C37	3	0	63	OR 25	1	0	99	OR 88	10	0
28	C39	6	4	64	OR 26	5	0	100	OR 89	10	0
29	C42	4	3	65	OR 29	10	0	101	OR 90	10	0
30	C76	2	1	66	OR 30	8	0	102	OR 97	10	0
31	C84	6	1	67	OR 32	8	0	103	OR 98	10	0
32	C86	1	0	68	OR 3	10	0	104	OR 99	10	0
33	C92	1	1	69	OR 36	10	0	105	OR167	10	0
34	C97	3	2	70	OR 40	10	0	106	OR171	0	0
35	C98	3	3	71	OR 42	10	0	107	OR236	0	0
36	C99	5	4	72	OR 43	10	0	108	OR158	8	0
								109	OR93	9	0

Patients RCH

	Nombre d'échantillon			Nombre de souches testées			Nombre souches AIEC +		
	Patients RCH			Patients RCH			Patients RCH		
1	OR 11	9	0	44	OR121	10	0		
2	OR 16	8	0	45	OR122	10	0		
3	OR 27	10	0	46	OR126	10	0		
4	OR 31	10	0	47	OR156	10	0		
5	OR 45	10	0	48	OR157	10	0		
6	OR 49	10	0	49	OR159	10	0		
7	OR54	10	0	50	OR164	10	0		
8	OR 135	10	0	51	OR163	10	0		
9	OR 134	2	0	52	OR161	10	0		
10	OR 136	6	0	53	OR165	10	0		
11	OR96	8	0	54	OR127	10	0		
12	OR103	10	0	55	OR128	7	0		
13	OR104	10	0	56	OR129	10	0		
14	OR82	9	0	57	OR130	10	0		
15	OR92	10	0	58	OR181	10	0		
16	OR95	10	0	59	OR182	10	0		
17	OR142	10	0	60	OR184	10	0		
18	OR141	10	0	61	OR186	10	0		
19	OR140	0	0	62	OR187	10	0		
20	OR68	10	7	63	OR168	5	0		
21	OR104	10	0	64	OR169	10	0		
22	OR105	10	0	65	OR201	10	0		
23	OR143	10	0	66	OR194	10	0		
24	OR144	10	0	67	OR197	10	0		
25	OR145	10	0	68	OR195	10	0		
26	OR107	8	0	69	OR20	0	0		
27	OR108	10	0	70	OR38	0	0		
28	OR109	5	0	71	OR66	0	0		
29	OR110	10	0	72	OR124	0	0		
30	OR146	10	0	73	OR139	0	0		
31	OR111	10	0	74	OR166	0	0		
32	OR112	10	0	75	OR224	0	0		
33	OR113	10	0	76	OR227	0	0		
34	OR114	10	0	77	OR257	0	0		
35	OR115	10	0	78	OR189	2	0		
36	OR116	10	0	79	OR131	10	0		
37	OR147	3	0	80	OR132	10	0		
38	OR148	10	0	81	OR133	10	0		
39	OR149	10	1	82	OR137	10	0		
40	OR153	10	0	83	OR138	10	0		
41	OR154	10	0	84	OR179	10	0		
42	OR119	10	0	85	OR180	10	0		
43	OR120	10	0	86	OR221	10	0		
				87	OR 6	10	0		

Sujets sains

		Nombre d'échantillon	Témoins sains	Nombre de souches testées	Nombre souches AIEC +	Nombre d'échantillon	Témoins sains	Nombre de souches testées	Nombre souches AIEC +
1	C201	4	0	47	C185	6	5		
2	C213	3	0	48	C186	4	2		
3	C218	11	3	49	C188	7	1		
4	C220	6	0	50	C189	7	2		
5	C222	2	2	51	C191	8	0		
6	C225	4	4	52	C192	5	0		
7	C226	3	1	53	C193	3	0		
8	C227	3	1	54	C194	2	0		
9	C228	2	1	55	C195	3	3		
10	C229	3	3	56	C196	2	2		
11	C230	1	1	57	C197	3	3		
12	C232	1	1	58	C198	4	0		
13	C235	3	1	59	C199	4	4		
14	C22	4	0	60	C200	2	1		
15	C33	5	1	61	C202	8	0		
16	C35	1	1	62	C207	4	1		
17	C41	5	1	63	C208	4	1		
18	C47	5	2	64	C209	4	0		
19	C48	1	0	65	C210	3	0		
20	C61	2	0	66	C211	2	1		
21	C63	4	0	67	C217	3	0		
22	C64	5	3	68	C219	7	0		
23	C72	3	0	69	OR190	10	0		
24	C73	2	0	70	OR192	10	0		
25	C81	4	2	71	OR193	10	0		
26	C85	4	2	72	OR200	9	0		
27	C87	1	1	73	OR 100	10	0		
28	C92	3	3	74	OR239	4	2		
29	C95	2	1	75	OR240	7	0		
30	C102	4	2	76	OR241	10	0		
31	C106	1	0	77	OR242	10	0		
32	C107	6	4	78	OR243	10	0		
33	C108	3	2	79	OR244	10	0		
34	C133	2	2	80	OR245	10	1		
35	C134	1	0	81	OR246	10	0		
36	C142	3	1	82	OR247	6	0		
37	C174	5	1	83	OR248	8	0		
38	C176	3	0	84	OR249	10	0		
39	C177	4	3	85	OR101	10	0		
40	C178	1	1	86	OR102	10	0		
41	C179	6	1	87	OR250	10	0		
42	C180	4	0	88	OR251	10	0		
43	C181	5	1	89	OR252	10	4		
44	C182	3	0	90	OR253	10	0		
45	C183	5	3	91	OR191	10	0		
46	C184	3	1	92	OR223	10	0		

5.2.8 Etude des scores d'invasion des souches AIEC dans les différents groupes :

L'analyse du score d'invasion des souches AIEC a été étudiée dans les différents groupes (Figure 24).

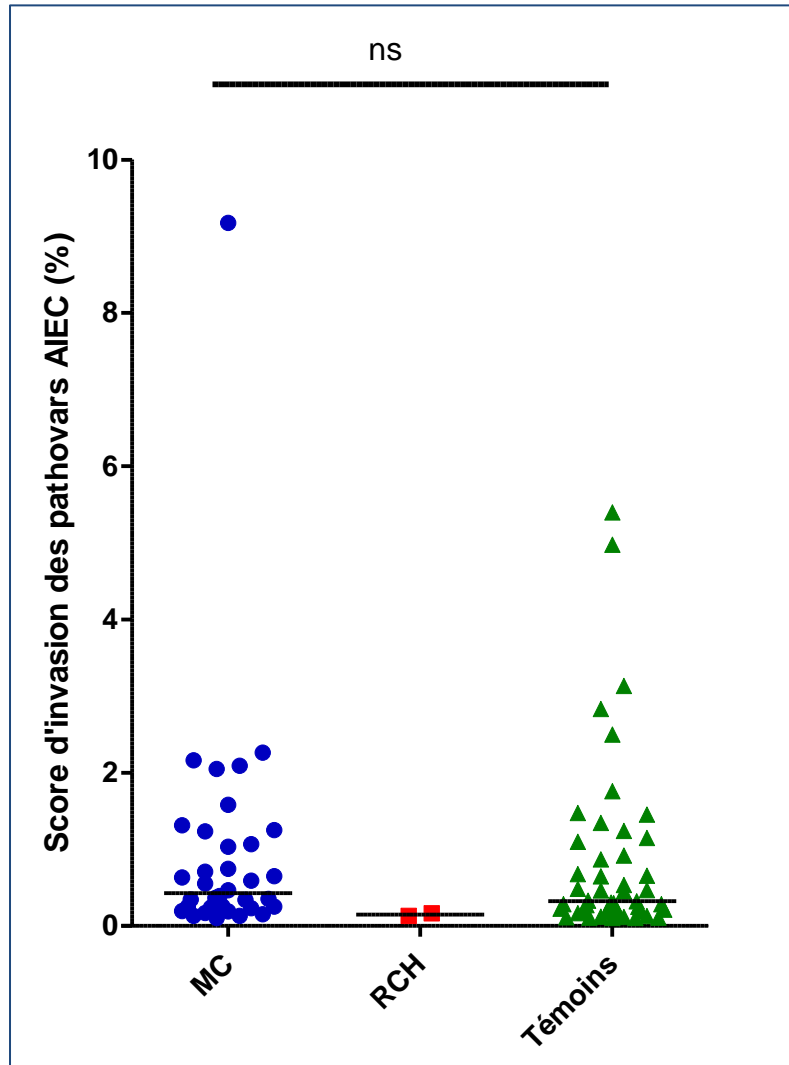


Figure 24 : Score d'invasion des souches AIEC dans les différents groupes.

Test statistique appliqué : test de Mann Whitney ; MC vs Témoins ns ($p=0,1935$) ; RCH vs Témoins ns ($p=0,9440$) et MC vs RCH ns ($p=0,7207$).

Chez les différents groupes, il n'existe pas de différences significatives en termes des scores d'invasion des souches AIEC (Figure 24). Le score d'invasion moyen est de 0.9%, 0.2% et de 0.8% respectivement chez les patients atteints de MC, chez les patients atteints de RCH et chez les témoins sains.

5.2.9 Etude du degré de similitude du pathovar AIEC :

Des dendrogrammes permettant de caractériser génétiquement le pathovar AIEC ont été obtenus par technique PFGE. Sur les 82 isolats bactériens, 71 profils génétiques différents ont été recensés, traduisant ainsi une forte variabilité des souches AIEC chez les patients et chez les témoins sains (Figure 25), d'où l'intérêt d'isoler plusieurs souches chez un même patient (Tableau 8).

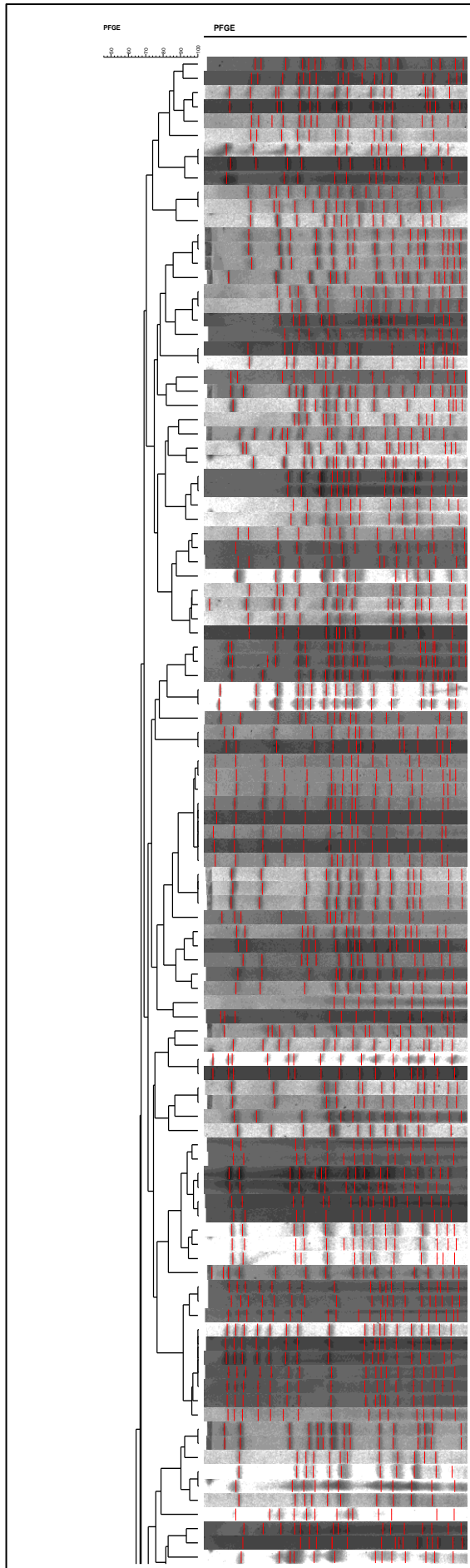


Figure 25 : Dendrogramme établi pour 82 souches AIEC des patients atteints de la MC et des individus sains.

5.2.10 Détermination des groupes phylogénétiques du pathovar AIEC chez les différents groupes :

Les souches AIEC détectées chez les patients atteints de MICI et chez les témoins sains sont étudiées pour leur profil phylogénétique. Actuellement, la mise au point de cette approche phylogénétique est en cours d'étude.

Afin d'étayer les données de prévalence des AIEC obtenues chez les 92 sujets sains issus de la cohorte, la fréquence d'isolement de ce pathovar a été investiguée à partir de la collection ECOR.

Les souches *E. coli* étudiées de la collection ECOR ont été isolées des fèces d'individus et d'animaux sains. Cette collection constitue ainsi un outil idéal d'évaluation de la prévalence des AIEC en condition saine. Cette étude a pour finalité de renforcer les données obtenues chez les sujets sains et de mieux caractériser le portage du pathovar AIEC en condition saine, qu'ils soient d'origine humaine ou animale, permettant une meilleure compréhension de la provenance des AIEC, de la niche environnementale potentielle et d'une possible transmission humaine.

Recherche des AIEC parmi les souches *E. coli* d'origine intestinale des individus et animaux sains issus de la collection ECOR.

Présentation de l'étude :

La collection ECOR renferme un total de 72 isolats d'*E. coli* provenant de matières fécales d'individus et de différentes espèces de mammifères sains ou présentant des infections du tractus urinaire^{118,119}. Les souches *E.coli* de cette collection reflètent une très grande hétérogénéité génotypique¹¹⁸ et géographique¹²⁰ car elles appartiennent à différents phylogroupes (A, B1, B2, D et E)¹¹⁸ et ont été isolées dans différents pays (principalement Etats-Unis et Suède)¹²⁰.

Dans cette étude, 61 souches *E. coli* d'origine fécale ont été analysées quant à leur capacité d'invasion *in vitro* sur la lignée cellulaire I-407, afin d'étudier la prévalence des AIEC et de compléter les données obtenues chez les témoins sains. Le Tableau 9 récapitule les différentes caractéristiques (hôte humain ou animal, pays d'isolement, phylogroupes) des souches *E. coli* intestinales de la collection ECOR qui ont été investiguées dans cette étude.

Modèle d'étude expérimental :

Prélèvements de souches *E. coli* issues de la collection ECOR :

- n=61 souches *E. coli* isolées d'individus et d'animaux sains (Tableau 9).

TABLEAU 9 : Caractéristiques des souches *E. coli* d'origine intestinale isolées d'individus et d'animaux sains issus de la collection ECOR^{120,98}.

ID	Sérotypes	Phylogroupes	Source		ID	Sérotypes	Phylogroupes	Source	
			Hôte	Lieu				Hôte	Lieu
ECOR1	ON:HN	A	Humain	USA	ECOR37	ON:HN	E	Ouistiti	USA
ECOR2	ON:H32	A	Humain	USA	ECOR38	O7:NM	D	Humain	USA
ECOR3	O1:NM	A	Chien	USA	ECOR39	O7:NM	D	Humain	Suède
ECOR4	ON:HN	A	Humain	USA	ECOR40	O7:NM	D	Humain	Suède
ECOR5	O79:NM	A	Humain	USA	ECOR41	O7:NM	D	Humain	Tonga
ECOR6	ON:NM	A	Humain	USA	ECOR42	ON:H26	E	Humain	USA
ECOR7	O85:HN	A	Orang-outan	USA	ECOR43	ON:HN	E	Humain	Suède
ECOR8	O86:HN	A	Humain	USA	ECOR44	ON:HN	D	Puma	USA
ECOR9	ON:NM	A	Humain	Suède	ECOR45	ON:HM	B1	Cochon	Indonésie
ECOR10	O6:H10	A	Humain	USA	ECOR46	O1:H6	D	Macaque nègre	USA
ECOR11	O6:H10	A	Humain	Suède	ECOR47	OM:H18	D	Mouton	Nouvelle Guinée
ECOR12	O7:H32	A	Humain	Suède	ECOR48	ON:HM	D	Humain	Suède
ECOR13	ON:HN	A	Humain	Suède	ECOR49	O2:NM	D	Humain	Suède
ECOR14	OM:HN	A	Humain	Suède	ECOR50	O2:HN	D	Humain	Suède
ECOR15	O25:NM	A	Humain	Suède	ECOR51	O25:HN	B2	Humain (enfant)	USA
ECOR16	ON:H10	A	Léopard	USA	ECOR52	O25:H1	B2	Orang-outan	USA
ECOR17	O106:NM	A	Cochon	Indonésie	ECOR53	O4:HN	B2	Humain	USA
ECOR18	O5:NM	A	Macaque nègre	USA	ECOR54	O25:H1	B2	Humain	USA
ECOR19	O5:HN	A	Macaque nègre	USA	ECOR55	O25:H1	B2	Humain	Suède
ECOR20	O89:HN	A	Bœuf	Bali	ECOR56	O6:H1	B2	Humain	Suède
ECOR21	O121:HN	A	Bœuf	Bali	ECOR57	ON:NM	B2	Gorille	USA
ECOR22	ON:HN	A	Bœuf	Bali	ECOR58	O112:H8	B1	Lion	USA
ECOR23	O86:H43	A	Éléphant	USA	ECOR59	O4:H40	B2	Humain	USA
ECOR24	O15:NM	A	Humain	Suède	ECOR60	O4:HN	B2	Humain	Suède
ECOR25	ON:HN	A	Chien	USA	ECOR61	O2:NM	B2	Humain	Suède
ECOR26	O104:H21	B1	Humain (enfant)	USA	ECOR62	O2:NM	B2	Humain	Suède
ECOR27	O104:NM	B1	Girafe	USA	ECOR63	ON:NM	B2	Humain	Suède
ECOR28	O104:NM	B1	Humain	USA	ECOR64	O75:NM	B2	Humain	Suède
ECOR29	O150:H21	B1	Rat-kangourou	USA	ECOR65	ON:H10	B2	Macaque nègre	USA
ECOR30	O113:H21	B1	Bison	Canada	ECOR66	O4:H40	B2	Macaque nègre	USA
ECOR31	O79:H43	E	Léopard	USA	ECOR67	O4:H43	B1	Chèvre	Indonésie
ECOR32	O7:H21	B1	Girafe	USA	ECOR68	ON:NM	B1	Girafe	USA
ECOR33	O7:H21	B1	Mouton	USA	ECOR69	ON:NM	B1	Macaque nègre	USA
ECOR34	O88:NM	B1	Chien	USA	ECOR70	O78:NM	B1	Gorille	USA
ECOR35	O1:NM	D	Humain	USA					
ECOR36	O79:H25	D	Humain	USA					

Résultats :

La prévalence du pathovar AIEC a été investiguée parmi les souches *E. coli* de la collection ECOR. Parmi les 61 souches *E. coli* de la collection ECOR, 29 sont d'origine humaine et les 32 autres d'origine animale.

Test de sensibilité à la gentamicine:

Toutes les souches de la collection ECOR se sont révélées être sensibles à la gentamicine.

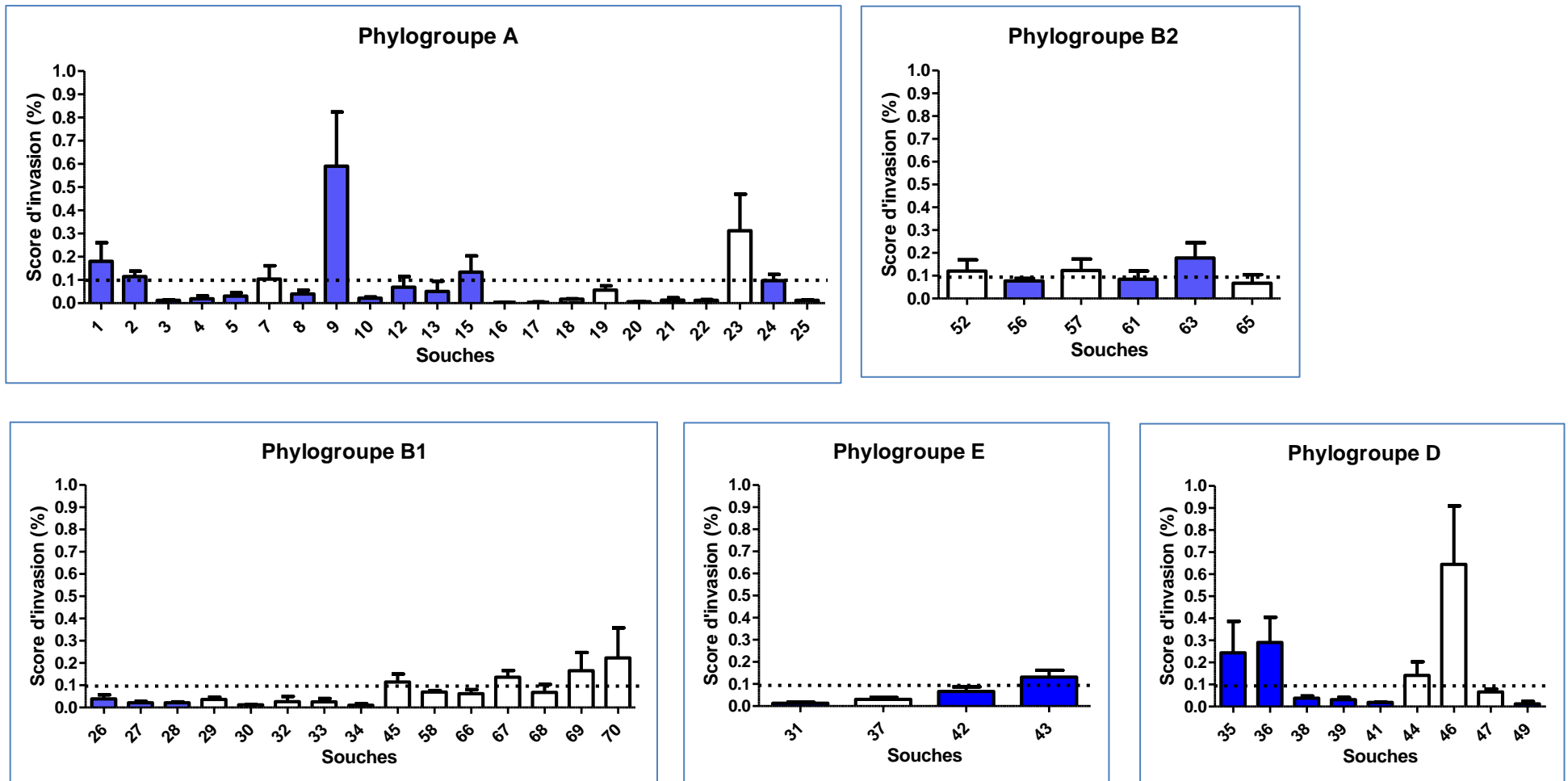
Evaluation de la capacité d'invasion des souches de la collection sur la lignée cellulaire I-407:

18 souches (30%) se sont révélées invasives, avec un taux d'invasion compris entre 0,10% et 0,64%. 8 sont d'origine humaine (28%), 4 appartiennent au phylogroupe A (ECOR 1, 2, 9 et 15), 1 au phylogroupe B2 (ECOR 63), 2 au phylogroupe D (ECOR 35 et 36), et 1 au phylogroupe E (ECOR 43). Les 10 autres sont d'origine animale (31%), 2 appartiennent au phylogroupe A (ECOR 7 et 23), 4 au phylogroupe B1 (ECOR 45, 67, 69 et 70), 2 au phylogroupe B2 (ECOR 52 et 57) et 2 au phylogroupe D (ECOR 44 et 46) (Figure 26). Au cours du test d'invasion, comme pour les souches isolées des matières fécales, une autre caractéristique pathologique inconnue est apparue pour 5 souches (les cellules épithéliales sont décrochées du support). Ces souches sont toutes d'origine humaine, l'une appartenant au phylogroupe A (ECOR 6), les 4 autres au phylogroupe B2 (ECOR 51, 53, 54 et 59). Les scores d'invasion de ces souches ne sont pas interprétables en raison de leur capacité à détacher les cellules adhérentes de la microplaque, se traduisant donc par une concentration bactérienne intracellulaire faussée.

Cette étude a ainsi permis de montrer que les *E. coli* intestinaux de la collection ECOR pouvaient être divisés en trois principaux groupes (comme les souches des prélèvements fécaux) selon leurs phénotypes invasifs réalisés *in vitro* sur les cellules I-407:

- i souches non invasives,
- ii souches invasives,
- iii souches capables de détacher les cellules I-407.

En effet, sur un total de 61 souches d'*E. coli* d'origine intestinale humaine et animale, 38 ne sont pas invasives, 18 présentent des propriétés invasives et 5 souches d'origine humaine sont capables de détacher les cellules I-407. Les souches invasives et les souches capables de détacher les cellules I-407 ont été étudiées dans la recherche des principaux gènes de virulence associés aux pathotypes entéropathogènes.



- Souches d'origine humaine
- Souches d'origine animale

Figure 26 : Score d'invasion des souches *E. coli* de la collection ECOR.

Recherche des principaux gènes de virulence associés aux *E. coli* entéro-pathogènes sur les souches invasives et cytotoxiques de la collection:

Les 18 souches fécales précédemment testées comme invasives ont été évaluées pour leur profil génotypique des 12 principaux gènes de virulence sélectionnés associés aux pathotypes *E. coli* EHEC (*stx-1*, *stx-2*, *eae* et *ehxA*), EIEC (*ipaC*), ETEC (*estA*, *elt* et *tia*), EPEC (*eae*, *ehxA*, *bfpA*), EAEC (*aggR* et *pCVD432*) et DAEC (*afaD*) (Tableau 4).

3 souches sont positives pour le gène *tia* (ECOR 57) et les gènes *tia* et *afaD* (ECOR 63 et 70). Ces souches n'appartiennent donc pas au pathovar AIEC mais aux pathotypes ETEC / DAEC. Les 15 autres souches invasives (ECOR 1, 2, 9, 15, 35, 36, 43, 7, 23, 45, 67, 69, 52, 44, 46) sont négatives pour les gènes de virulence testés, excluant ainsi leur affiliation aux pathotypes décrits précédemment (Tableau 10). Les souches ECOR 1, 2, 9, 15, 35, 36, 43, 7, 23, 45, 67, 69, 52, 44, 46 peuvent être considérées appartenant au pathovar AIEC, sous la réserve de leur capacité à survivre et à se répliquer dans les macrophages.

Les souches capables de détacher les cellules épithéliales I-407 ont également été testées pour leur expression des gènes de virulence associés aux souches entéro-pathogènes. La souche ECOR 51 s'est révélée exprimer le gène de virulence *afaD*, cette souche ne pouvant être considérée comme une AIEC mais comme une DAEC. Les autres souches cytotoxiques étaient négatives pour les gènes testés (Tableau 10).

TABLEAU 10 : Résumé des caractéristiques des souches invasives et des souches capables de détacher les cellules I-407.

Origine	Type de souches	Références	Sérotype	Phylogroupe	Source	Gènes de virulence											
						stx-1	stx-2	ipaC	estA	eElt	tia	bfpA	eae	exhA	aggR	pCVD432	afaD
HUMAINE	Souches invasives	ECOR1	ON:HN	A	Humaine, USA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ECOR2	ON:H32	A	Humaine, USA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ECOR9	ON:NM	A	Humaine, Suède	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ECOR15	O25:NM	A	Humaine, Suède	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ECOR63	ON:NM	B2	Humaine, Suède	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
		ECOR35	O1:NM	D	Humaine, USA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ECOR36	O79:H25	D	Humaine, USA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ECOR43	ON:HN	E	Humaine, Suède	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ANIMALE		ECOR7	O85:HN	A	Orang outan, USA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ECOR23	O86:H43	A	Eléphant, USA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ECOR45	ON:HM	B1	Cochon, Indonésie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ECOR67	O4:H43	B1	Chèvre, Indonésie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ECOR69	ON:NM	B1	Macaque, USA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ECOR70	O78:NM	B1	Gorille, USA	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
		ECOR52	O25:H1	B2	Orang outan, USA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ECOR57	ON:NM	B2	Gorille, USA	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
HUMAINE	Souches décrochant les cellules I-407	ECOR44	ON:HN	D	Puma, USA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		ECOR46	O1:H6	D	Macaque, USA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		ECOR6	ON:HM	A	Humaine, USA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		ECOR51	O25:HN	B2	Humaine, USA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
		ECOR53	O4:HN	B2	Humaine, USA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ECOR54	O25:H1	B2	Humaine, USA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
ECOR59	O4:H40	B2	Humaine, USA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

Capacité d'adhésion et de survie et de réplication des souches invasives de la collection ECOR

Les 15 souches révélées comme invasives et ne présentant pas les gènes de virulence associés au pathotype d'*E. coli* enteropathogènes, ont été testées pour leur capacité à adhérer aux cellules épithéliales I-407 et pour leur aptitude à survivre et à se répliquer dans les macrophages.

Les souches révélées comme invasives ont été testées pour leur capacité à adhérer. Toutes les souches invasives de la collection ECOR présentent des propriétés d'adhésion, avec un indice d'adhésion compris entre 67 et 334 (score > 1 bactérie par cellule) (Tableau 11).

Parmi ces souches, 13 sont capables de survivre et de se répliquer dans les macrophages. Le pourcentage de bactéries intracellulaires à 1 et 24 heures post infection varie entre 114,06% et 881,36% (les 13 souches affichent un score de réplication > 100%) (Tableau 10). Les souches ECOR 1, 2, 9, 15, 35, 36, 43, 23, 45, 67, 69, 52, 44 sont donc considérés comme appartenant au pathotype AIEC.

Les 2 autres souches (ECOR 46 et 7) n'ont pas été capables de se répliquer à l'intérieur des macrophages avec un indice de 70,42% et 74,51% respectivement (Tableau 11). Ces souches ne sont donc pas affiliées au pathovar AIEC.

TABLEAU 11 : Capacité d'adhésion sur les cellules I-407 et de survie et de réplication à l'intérieur des macrophages J774-A1 parmi les 15 souches invasives de la collection ECOR.

	Souches ECOR	Index d'adhésion	Index de réplication bactérienne à 1h et 24h postinfection (%)
Souches invasives	ECOR1	197,89±29,77	387,47%±236,00%
	ECOR35	210,53±208,41	881,36%±295,06%
	ECOR52	73,26±2,38	133,33%
	ECOR2	111,58±32,75	168,72%±5,67%
	ECOR36	145,26±68,48	511,41%±70,89%
	ECOR43	82,11±20,84	114,06%±142,24%
	ECOR44	334,74±229,25	255,70%±35,56%
	ECOR45	94,74±20,84	314,08%±268,26%
	ECOR46	92,63±17,86	70,42%
	ECOR7	170,53±74,43	74,51%
	ECOR9	157,89±56,57	152,00%
	ECOR15	153,68±44,66	279,07%
	ECOR23	260,63±48,23	395,48%
	ECOR67	67,37±23,82	361,90%
	ECOR69	117,89±41,68	887,64%
Souches de référence non invasives	<i>E. coli</i> K12	51,58±16,38	24,59%±2,84
	<i>E. coli</i> Nissle	32,21±8,30	87,78%±131,98%
Souches de référence invasives	AIEC LF82	166,32±20,84	220,59%
	AIEC NRG857c	54,32±4,17	194,90%±39,93

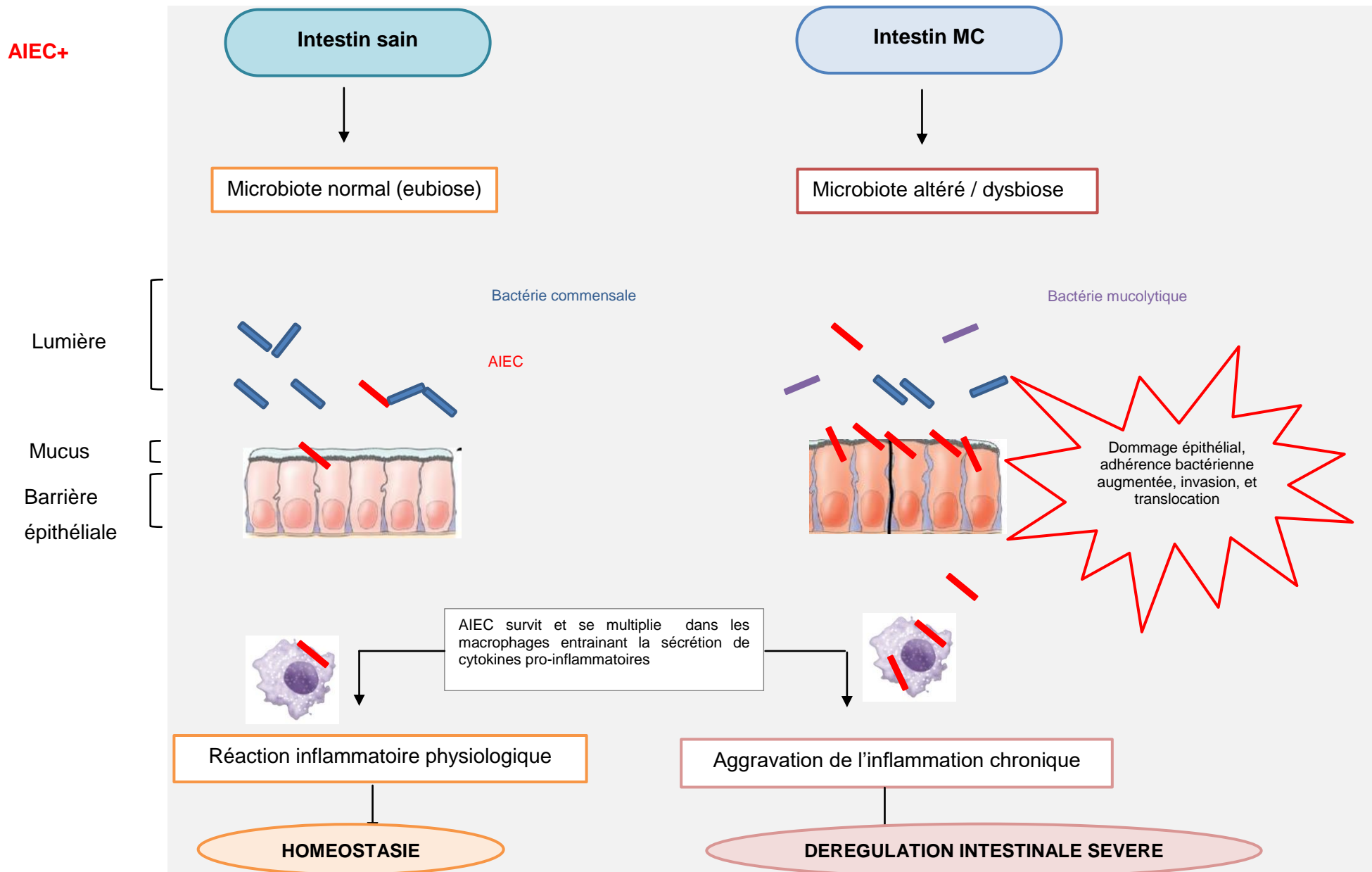
En considérant l'ensemble des souches de la collection, la prévalence des AIEC est ainsi estimée à environ 21% (13/61). Ces résultats tendent à corroborer les données obtenues chez la cohorte des sujets sains puisque nous montrons que le pathovar AIEC est retrouvé en contexte non pathologique au niveau luminal.

Cette étude a également permis de montrer que ce pathovar AIEC est aussi retrouvé chez différents hôtes animaux sains, ouvrant ainsi le questionnement sur son réservoir naturel et sa transmissibilité. En effet, 6 souches répondant aux caractéristiques des AIEC ont été retrouvées chez différents hôtes animaux en bonne santé, 1 souche provenant d'un macaque, 1 souche d'un orang-outan, 1 autre d'un éléphant, 1 souche d'un cochon, 1 d'une chèvre et 1 d'un puma.

6. Hypothèse scientifique :

Au vue de l'ensemble des résultats, il semblerait que les AIEC soient plutôt à considérer comme des pathobionts (voir discussion) (Figure 27).

Figure 27: Hypothèse du rôle des AIEC dans les MICI, AIEC considérés comme des pathobionts.



DISCUSSION :

- Résultats :

A l'issue de ce travail de thèse, nous avons pu démontrer pour la première fois :

- la détection du pathovar *E. coli* adhérent et invasif au niveau luminal chez les patients atteints de la MC et de la RCH, dans 1/7 des cas chez les patients atteints de la MC, dans 1% des cas chez les patients atteints de la RCH, et dans 1/5 des cas chez les sujets sains (Tableau 8),
- une prévalence plus importante du pathovar AIEC chez les sujets sains vs patients atteints de MC et RCH (51% vs 33% et 2% respectivement) (Figure 21),
- une quantification du pathovar AIEC très aléatoire chez la cohorte de patients et de témoins (Figure 22). Les souches AIEC, lorsqu'elles sont présentes, peuvent être en dominance ou en sous-dominance par rapport à la flore *E. coli*, représentant en moyenne entre 20 à 30% (Figure 23),
- des souches autant invasives chez les patients atteints de MICI que chez les sujets sains (Figure 24),
- une forte variabilité du pathovar AIEC chez les patients atteints de MC et chez les sujets sains, un même individu pouvant héberger différents AIEC (Figure 25).

L'ensemble de ces données a pu être conforté par l'étude de la prévalence des AIEC sur une collection de souches *E. coli* isolées de mammifères en bonne santé. A l'issue de ce travail, nous avons pu montrer la détection des AIEC chez environ 24% de témoins sains et 19% d'animaux sains. Des AIEC ont pu être retrouvés chez différents hôtes animaux, comme l'orang outan, l'éléphant, le macaque, le cochon, la chèvre, le puma.

- Apport par rapport à la littérature / Résultats :

Chez les patients atteints de MICI, une dysbiose de la flore bactérienne a été décrite, caractérisée de manière générale par une réduction de la diversité de la flore bactérienne, par une réduction du phylum des Firmicutes et à contrario par une augmentation du phylum des Protéobactéries. Bien qu'aucun agent bactérien causal des MICI n'ait été identifié, de nombreuses études ont signalé l'implication potentielle de pathogènes microbiens tels que *Mycobacterium avium paratuberculosis*, *Clostridium difficile*, *Helicobacter spp*, *Campylobacter spp* et des bactéries commensales présentant une altération fonctionnelle comme le pathovar AIEC, *Bacteroides fragilis* entérotoxigène dans la physiopathologie des MICI⁹⁸.

Durant ces 20 dernières années, le microorganisme appartenant à l'espèce bactérienne *E. coli* a suscité un grand intérêt dans le contexte de la MC¹²². Au niveau de la muqueuse de patients atteints de MICI, des souches non pathogènes d'*E. coli* ont été trouvées en plus forte prévalence, elles présentent la capacité à induire des lésions épithéliales après interaction avec les cellules immunitaires (notamment avec les cellules dendritiques) entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, l'interféron (IFN), l'IL-6, l'IL-23p19, l'IL-12p35 et l'IL-17F et des chimiokines telles que l'IL-8, CXCL1 et CXCL2¹²³ (Figure 28). La croissance excessive de la population des *E. coli* chez les patients atteints de MICI est actuellement inexplicée mais peut être liée à une production accrue d'espèces réactives de l'azote⁹⁹. En concordance avec la littérature, notre étude a permis de montrer une quantité significativement plus élevée des bactéries du genre *E. coli* au niveau luminal chez les patients atteints de MC (6.83 log UFC/g) en comparaison aux patients RCH (5.77 log UFC/g) et aux sujets sains (6.38 log UFC/g).

Bien que la majorité des souches d'*E. coli* se soient révélées non pathogènes, certaines présentent néanmoins des propriétés de virulence et d'invasion, portant le nom d'AIEC¹²³.

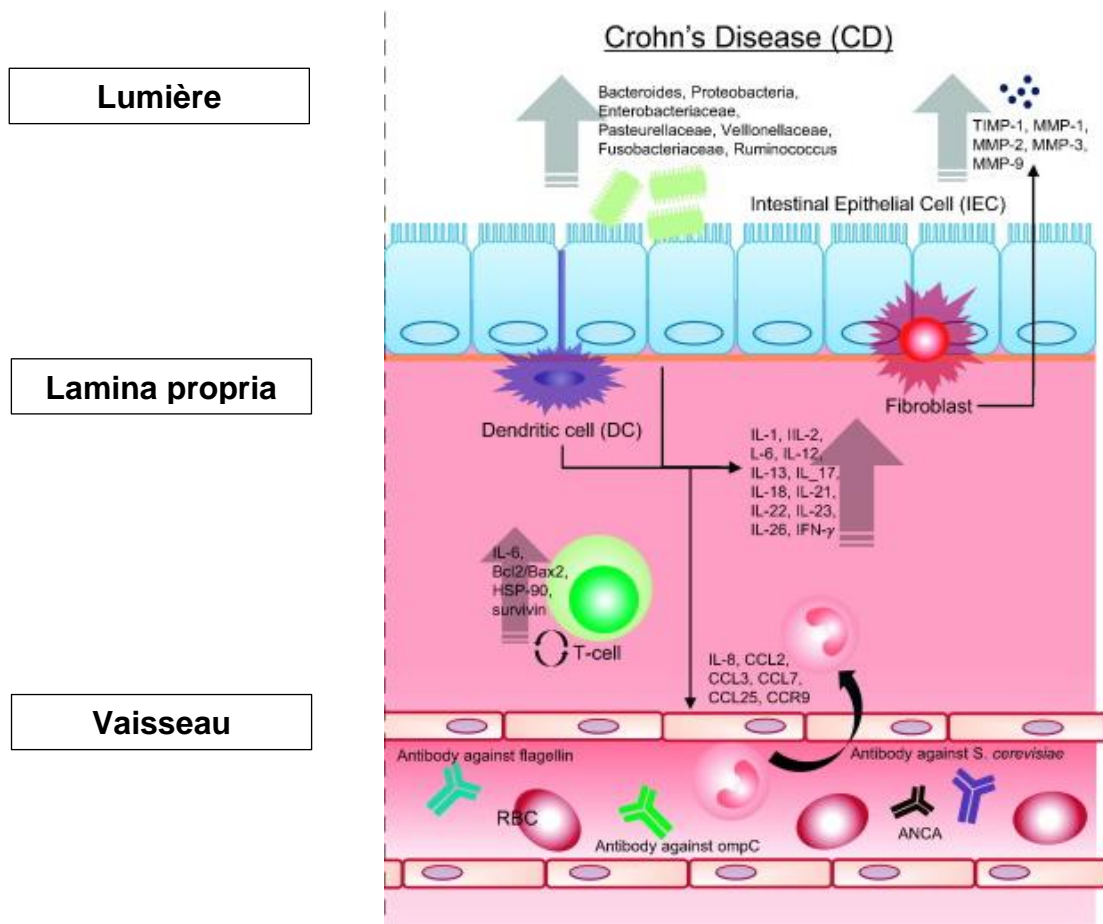


Figure 28 : Rôle de différentes molécules inflammatoires impliquées dans la physiopathologie de la MC¹²³.

Le pathotype AIEC a été décrit pour la toute première fois chez des patients atteints de MICI. Plusieurs groupes de recherche indépendants ont par ailleurs montré une prévalence plus élevée de ce pathovar d'*E. coli* au niveau de biopsies de patients atteints de MICI par rapport à des patients non MICI. Cependant, la prévalence de ce pathovar varie considérablement d'une étude à l'autre. En effet, la prévalence des AIEC est estimée entre 10% et 52% dans les biopsies iléales de patients atteints de la MC^{90,124,88,125}. Cette prévalence diminue même à 3,7% dans les biopsies coliques des patients atteints de la MC, et à 0% dans les biopsies coliques des patients atteints de RCH¹⁰⁷. Dans les contrôles non MICI regroupant notamment des patients présentant des désordres intestinaux hors MICI, la prévalence des AIEC s'est révélée être comprise entre 0 et 17%^{90,124,88,125}.

Dans notre étude, nous avons pu montrer pour la première fois que des souches répondant aux caractéristiques des AIEC sont détectées au niveau luminal chez les patients atteints de la MC et de RCH et également chez des sujets en bonne santé, avec une prévalence de 33%, 2% et 51% respectivement (Figure 21). Ces données ont permis d'établir une détection plus forte des souches répondant aux caractéristiques du pathovar AIEC chez des témoins sains au niveau luminal, allant ainsi à l'encontre avec les données de la littérature. Ces résultats soulèvent ainsi la question de la réelle implication des AIEC dans les MICI, nos études ont en effet plutôt tendance à les reconsidérer comme des pathobionts (Figure 27). Les pathobionts se distinguent des agents pathogènes bactériens car ils ne deviennent pathologiques qu'à la suite d'un stimulus environnemental spécifique chez des individus génétiquement prédisposés. Un pathobiont correspond ainsi à un symbiote pouvant acquérir des propriétés virulentes chez un hôte prédisposé génétiquement en raison de facteurs environnementaux et/ou diététiques et ainsi favoriser l'inflammation intestinale^{126, 81}.

Afin d'étayer notre hypothèse, différents points ont été investigués chez les patients atteints de MICI en comparaison aux sujets sains. Ces différents points concernent la quantification moyenne des AIEC, leur proportion par rapport à la flore *E. coli* ainsi que leur score d'invasion *in vitro* sur les cellules épithéliales de la lignée I-407. En termes de quantification des AIEC, nous avons pu démontrer une quantité plus élevée des souches AIEC chez les patients atteints de RCH que chez les témoins, ceci probablement dû à la faible variabilité chez ce groupe de patients. Aucune différence significative n'a été relevée chez les patients atteints de la MC par rapport aux témoins sains. Dans notre étude, nous avons également pu démontrer pour la première fois que le pathovar AIEC, lorsqu'il est présent, peut être en dominance ou en sous-dominance par rapport à la flore *E. coli*, et cette analyse a été établie dans les 3 groupes. Par rapport à la flore *E. coli*, ce pathovar représente en moyenne entre 20 à 30% chez les patients atteints de MICI et chez les sujets sains, sans différences notables entre ces groupes. Et concernant l'invasion, nous avons pu soulever aucune différence significative des scores d'invasion des isolats AIEC des patients atteints de MICI, comparativement aux témoins sains, les souches AIEC des patients ne sont ainsi pas plus invasives que celles des sujets sains.

Au vue de ces résultats, la question de la réelle implication des AIEC dans les MICI reste en suspens. Nos données ont plutôt tendance à requalifier les AIEC comme des pathobionts ou à les écarter des pathologies digestives.

- Reconsidérer les AIEC comme pathobionts car des études ont démontré les effets délétères du pathovar AIEC sur l'immunité de la muqueuse de l'hôte, sur l'intégrité de la barrière et dans l'induction de l'inflammation dans de nombreux modèles animaux.

Une altération de l'homéostasie intestinale entraîne l'expansion de l'AIEC et une fonction de barrière compromise. Les AIEC sont capables d'envahir, de survivre et de se répliquer à l'intérieur des cellules hôtes, entraînant une exacerbation du dysfonctionnement de la barrière par une perturbation des protéines jonctions serrées⁹⁸.

Par ce dysfonctionnement de la barrière épithéliale, l'AIEC est capable de pénétrer dans la couche de mucus et de s'affranchir de l'effet des peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules en gobelet (voir partie IV du chapitre 2). Le pathovar *E. coli* intestinal pénétrerait dans la couche de mucus en favorisant sa dégradation par des protéases. Une protéase récemment décrite et sécrétée par l'AIEC (VAT-AIEC) contribue à la colonisation intestinale de l'AIEC dans un modèle murin, en favorisant la propagation des bactéries à travers la couche de mucus et leur adhésion aux cellules épithéliales intestinales. La sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules en gobelet peut également être altérée par certains isolats AIEC. Deux principaux gènes retrouvés chez les souches AIEC, localisés dans une région plasmidique, *arlA*, qui code une protéine de la famille Mig-14 impliquée dans la résistance à la défensine, et *arlC*, une protéase de la membrane externe de la famille OmpT, ont été incriminés dans la perturbation de l'intégrité de la barrière intestinale⁹⁸.

Des études ont mis en évidence l'importance d'une dysbiose et / ou d'un état inflammatoire intestinal antérieures pour permettre l'implantation de l'AIEC. Chez les souris, la colonisation par l'AIEC ne se produit qu'après un traitement par DSS, un traitement avec des antibiotiques, ou un régime riche en graisses et en sucre. Un modèle plausible de développement de la MC est une altération du microbiote intestinal à la suite d'un événement aigu, comme une gastro-entérite infectieuse ou l'utilisation d'antibiotiques à large spectre, ces conditions

favorisent l'implantation de l'AIEC. La potentialisation de la gastro-entérite infectieuse aiguë chez des souris précédemment colonisées par l'AIEC peut entraîner une expansion de l'AIEC et une réponse inflammatoire intestinale chronique avec des dommages intestinaux. Ces résultats suggèrent que les individus colonisés par l'AIEC au moment d'un événement de gastro-entérite aiguë peuvent être plus à risque à développer la MC⁹⁸.

D'autres arguments soulignent l'importance d'un état inflammatoire pré-existant et/ou d'une dysbiose intestinale afin de permettre une colonisation de l'AIEC. Par exemple, Chassaing et al. ont montré des changements dans le microbiote intestinal après une colonisation par l'AIEC sur des souris dépourvues de récepteurs de la flagelline TLR5 (T5KO), développant une colite spontanée. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la colonisation transitoire de l'AIEC chez les souris T5KO entraîne une altération du microbiote intestinal avec un potentiel pro-inflammatoire plus important, cette dysbiose peut persister chez l'hôte et induire une inflammation chronique¹²⁷.

Ainsi, les AIEC, s'ils sont considérés comme pathobionts, pourraient exacerber une inflammation déjà préexistante chez les patients atteints de MICI, modifiant la composition du microbiote intestinal et entraînant une activation accrue du système immunitaire innée et de l'expression de cytokines pro-inflammatoires¹²⁷.

- Reconsidérer les AIEC comme non impliqués dans les MICI au vue de la forte détection de ces souches au niveau luminal chez des individus en bonne santé. *E. coli* est une espèce bactérienne ayant une grande faculté d'adaptation¹²⁸. Les plasmides conjugués sont des vecteurs de transfert de gènes horizontaux, correspondant à un processus clé de l'adaptation bactérienne. L'acquisition d'un plasmide peut permettre la réplication de l'hôte bactérien, peut perturber la régulation de la cellule hôte ou avoir des effets toxiques sur la cellule, par exemple à cause d'un mauvais repliement des protéines¹²⁹. Il est ainsi possible d'émettre l'hypothèse que le pathovar AIEC, issu initialement d'*E. coli* de la flore commensale, ait acquis des mutations, sans toutefois être pathogène pour l'hôte.

Les données complémentaires obtenues sur les souches issues de la collection ECOR, confortent nos résultats de détection des AIEC chez les sujets sains.

La collection ECOR est considérée comme une collection standard reflétant la diversité génétique des *E. coli* non pathogènes isolés chez les humains et les animaux de divers lieux géographiques. Nous avons étudié un total de 61 souches d'*E. coli* d'origine intestinale isolées d'individus sains pour leur phénotype invasif (Tableau 9). Notre étude a permis de démontrer la présence de souches AIEC dans les matières fécales d'individus sains, Nos résultats ont montré que les *E. coli* d'origine intestinale de la collection ECOR pouvaient être divisés en trois groupes en fonction de leurs phénotypes observés *in vitro* dans les cellules I-407: i) souches non invasives, ii) souches invasives définies comme AIEC et iii) souches capables de détacher la monocouche de cellules I-407.

Sur un total de 61 souches d'*E. coli*, 38 ne sont pas invasives, 18 présentent des propriétés adhérentes et invasives et 5 sont capables de détacher les cellules I-407. Parmi les 18 souches adhérentes et invasives, 13 sont capables de survivre et de se répliquer à l'intérieur des macrophages, ces souches répondent donc aux caractéristiques du pathotype AIEC (Tableau 11). Ainsi, parmi toutes les souches fécales, la prévalence des AIEC est estimée à 21% (24% d'origine humaine et 19% en ne considérant que les souches animales). Les souches AIEC de la collection ECOR sont génétiquement très diversifiées, du fait de leur appartenance à différents phylogroupes. En effet, parmi les 13 souches adhérentes et invasives identifiées dans cette étude, 5 appartiennent au phylogroupe A, 3 au phylogroupe B1, 1 au phylogroupe B2, 3 au phylogroupe D et 1 au phylogroupe E. Il a été démontré que les *E. coli* appartenant aux phylogroupes B2 et D possèdent un plus grand nombre de gènes de virulence que les phylogroupes A et B1. Cependant, récemment, aucune association n'a été trouvée entre le fond phylogénétique et l'apparition de la diarrhée chez les veaux¹³⁰. La majorité des souches d'AIEC isolées à ce jour, provenant d'humains ou d'animaux malades, appartient au phylogroupe B2^{90, 124, 131, 109, 101}. Les souches d'AIEC isolées de témoins non MICI (principalement des patients souffrant de rectorragies, d'hémorroïdes, du syndrome du côlon irritable ou de diverticulite) appartiennent également principalement au phylogroupe B2⁹⁰. Bien que le pathovar AIEC soit souvent associé au phylogroupe B2, renfermant le plus de facteurs de virulence, certains isolats AIEC appartiennent aux autres phylogroupes A, B1 et D. Cette distribution phylogénétique suggère que le phénotype AIEC a probablement évolué plusieurs fois. Nous avons montré ici que les souches d'AIEC isolées d'individus sains,

qu'ils soient humains ou animaux, appartiennent à différents phylogroupes dont le phylogroupe B2.

Dans notre étude, un phénotype particulier a été observé sur certaines souches de la collection ECOR sur la lignée cellulaire I-407, il s'agit de leur capacité à détacher les cellules du support. Certaines études ont rapporté la présence de déterminants génétiques de virulence et des profils cytotoxiques parmi les souches *E. coli* de la collection ECOR^{97,132,133,134}. Parmi les souches de la collection ECOR qui ont été démontrées invasives et qui décrochent les cellules I-407 du support microplaque, certaines présentent des gènes de virulence comme les pili (*pap*) associés à la pyélonéphrite, les adhérences de la famille S (*sfa*), l'hémolysine (*hly*), les long polar fimbriae (*lpf*), la toxine autotransporteuse (*sat*). Parmi les 13 souches répondant aux caractéristiques du pathobiont AIEC, 10 sont connues pour exprimer au moins un de ces gènes (ECOR 2, 35, 36, 43, 23, 45, 67, 69, 52 and 44) et parmi les 5 souches qui décrochent les cellules, 3 hébergent au moins un de ces déterminants de virulence (ECOR 51,53 et 54) (Tableau 12)^{132,118,133,135}. Certains de ces gènes ont également été retrouvés sur des souches AIEC isolées à partir de biopsies de patients souffrant de MICI et de patients non MICI. Martinez et al. ont montré que sur un total de 16 souches AIEC provenant de biopsies de patients atteints de MICI, 8 expriment le gène *papC*, 2 expriment le gène *sfa*, 4 expriment le gène *hlya*, et toutes expriment le gène *fimH*. Les souches AIEC provenant de patients non MICI (n=6) expriment également ces gènes, 4 étaient positives pour *papC*, 2 pour *sfa*, 2 pour *hlya* et toutes pour *fimH*⁹⁰.

TABLEAU 12 : Déterminants génétiques de virulence des souches AIEC et des cellules capables de décrocher les cellules I-407 parmi la collection ECOR.

ECOR strains		AIEC phenotype												References	
		ECOR43	ECOR23	ECOR36	ECOR69	ECOR52	ECOR1	ECOR2	ECOR9	ECOR15	ECOR35	ECOR45	ECOR67		ECOR44
Virulence determinants associated with pathogenicity islands	two adhesin gene clusters <i>sfa</i> and <i>pap</i>	-	-	+ pap1.2.3	-	+ pap1.2.3 sfa1.2	-	+ pap1.2.3	-	-	+ pap1	-	-	+ pap1.2.3	Fidema Boyd et al., 1998
	the <i>kps</i> capsule operon	-	-	+ kps1.2	-	+ kps1.2	-	-	-	-	+ kps1.2	-	-	+ kps1.2	
	the alpha-hemolysin loci <i>hlyI</i> and <i>hlyII</i>	+ hly2	-	-	-	+ hly2	-	-	-	-	-	-	-	-	
Haemolytic activity	PCR detection of the <i>hlyA</i> gene	No haemolysis	ND	ND	ND	+ Strong haemolysis	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Xin-He Lai et al., 1999
Distribution of STEC-lpfAs	Four lpfA genetic variants designated lpfAO157/OI-141, lpfAO157/OI-154, lpfAO26 and lpfAO113	lpfAO26+ lpfAO157/ OI-141+	lpfAO26+ lpfAO113+	lpfAO113+	lpfAO113+	-	-	-	-	-	lpfAO113+	lpfAO26+ lpfAO113+	lpfAO26+ lpfAO113+	lpfAO113+	Toma et al., 2006
Antibiotic resistance in the ECOR collection	Streptomycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mazel et al., 2000
	Spectinomycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Sulfonamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Tetracyclin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ampicillin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Kanamycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Cloramphenicol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Mercuric chloride	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ethidium bromide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Cette étude a également pu permettre d'apporter des informations quant au réservoir des AIEC chez des sujets sains puisque des souches invasives ont été trouvées chez l'hôte humain et chez différents hôtes animaux.

Nos travaux ont montré pour la première fois la détection de souches AIEC chez des différents hôtes animaux sains; une isolée d'un orang-outan, une d'un éléphant en captivité, une d'un macaque en captivité, une d'un cochon, une d'un puma et une d'une chèvre. Ces résultats fournissent un support supplémentaire pour l'absence de spécificité d'hôte de ce pathotype¹³⁶. D'autres études analysant la prévalence des AIEC chez des animaux malades et sains sont nécessaires afin de détecter les réservoirs des souches AIEC et d'évaluer la dimension du risque pour la mise en œuvre des mesures de prévention et de contrôle pour la santé publique.

En conclusion, cette étude a mis en relation une forte proportion de portage asymptomatique d'*E. coli* pathogène invasif au niveau intestinal, confirmant que les AIEC peuvent être considérés comme pathobionts^{91,125,127}.

- Limites

Des études de génomique comparative réalisées sur différentes souches AIEC et sur d'autres *E. coli* pathogènes et non pathogènes ont montré une forte variabilité génotypique, ce qui rend difficile l'identification de facteurs génétiques spécifiques aux AIEC. Malgré toutes les recherches menées sur l'étude de la pathogénicité de l'AIEC, les facteurs génétiques spécifiques au pathotype de l'AIEC demeurent méconnus. La majorité des gènes liés à sa pathogénicité ne lui sont pas spécifiques, comme c'est le cas pour *fimH*, *ompA*, *dsbA* ou *htrA*, gènes également présents dans les souches *E. coli* non pathogènes. À l'inverse, les gènes de virulence qui ne sont habituellement pas présents dans les bactéries *E. coli* non pathogènes, comme *afaC*, *pks* ou *lpf*, ont été trouvés fréquemment, mais pas systématiquement, dans les souches AIEC⁹¹. Et bien que le pathovar AIEC se distingue des autres pathovars *E. coli* par l'absence des déterminants de virulence tels que la shigatoxine et le système de sécrétion de type III, une identification génétique spécifique est actuellement impossible¹³⁷.

L'une des premières souches AIEC isolées en 1998 de l'iléon d'un patient atteint de MC, appelée LF82 (pour Lille-France), sert de référence dans la plupart des études

impliquant les souches d'*E. coli* associées aux MICI. Le génome complet de cette souche a été analysé, ainsi que celui de trois autres isolats d'AIEC humains hautement invasifs, NRG857c, UM146 et HM605 qui appartiennent tous au phylogroupe B2. Les souches LF82 et NRG857c semblent génétiquement apparentées car elles présentent toutes les deux le sérotype O83:H1, une séquence de type ST135 et appartiennent au phylogroupe B2. Cependant, d'autres isolats d'AIEC, telles que les souches séquencées 541-1, 541-15 et 576-1, présentent différents sérotypes et phylotypes (voir chapitre 3). Bien que les données de séquence du génome des AIEC ne permettent pas une identification spécifique des AIEC, elles contribuent néanmoins à l'identification des déterminants génétiques des AIEC impliqués dans l'invasion et la croissance intracellulaire.

Le pathovar AIEC est actuellement identifié phénotypiquement *in vitro* par i) leur capacité à adhérer et à envahir les cellules épithéliales intestinales, ii) leur capacité à survivre et à se répliquer dans les macrophages, iii) l'absence de gènes de virulence associés aux pathovars *E. coli* entéropathogènes. La caractérisation actuelle des AIEC repose donc sur différents tests phénotypiques, basés sur des modèles de culture cellulaire. Ces techniques sont fastidieuses et longues, une méthodologie plus spécifique et plus rapide d'identification des AIEC reste une perspective d'étude.

En se basant sur une étude menée par Nash et al. sur l'identification de potentiels déterminants virulents de la souche AIEC NRG857c qui a montré au niveau génomique la présence de nombreux facteurs de virulence incluant les adhésines, les hémolysines, les antigènes capsulaires et somatiques, l'acquisition du fer, la résistance aux ATB... (Tableau 13), différentes approches ont été menées lors de ma thèse afin de proposer un marqueur spécifique au pathovar AIEC. La cinétique de croissance bactérienne en condition acide, l'étude de la sensibilité à différents antibiotiques, et la capacité de formation de biofilms et de la production de fimbriae de différents AIEC comparés à une souche *E. coli* de référence non invasive sont les principales pistes explorées en vue de la recherche de marqueurs spécifiques d'identification des AIEC et constituent des résultats préliminaires.

TABLEAU 13 : Facteurs de virulence de la souche AIEC NRG857c¹³⁸.

Locus Tag	Gene Name	Identity (%)	Function	Related Pathotype
Chromosome				
Adhesins				
NRG857_00540	<i>hcpA</i>	89	adherence	EHEC
NRG857_05010	<i>csgE</i>	100	assembly/transport component in curli production	Common
NRG857_17655	<i>lpfA2</i>	85	major fimbrial subunit of Long Polar Fimbriae (Lpf), named <i>lpfA2</i>	EPEC, EHEC
NRG857_21765	<i>fimA</i>	77	major fimbrial subunit of type 1 fimbriae	Common
NRG857_21795	<i>fimH</i>	99	adhesin of type 1 fimbriae	Common
Iron acquisition/Transport systems				
NRG857_06120	<i>fepC</i>	79	ferric enterobactin transport ATP-binding protein	UPEC, EHEC
NRG857_09890	<i>irp2</i>	95	yersiniabactin biosynthetic protein	UPEC
NRG857_09895	<i>irp1</i>	91	yersiniabactin biosynthetic protein	UPEC
NRG857_09915	<i>fyuA</i>	95	pesticin/yersiniabactin receptor protein	UPEC
NRG857_17390	<i>chuA</i>	94	outer membrane receptor protein, heme utilization/transport protein	UPEC, EHEC
Capsular and somatic antigens				
NRG857_14650	<i>kpsM-II</i>	94	Involved in polysialic acid transport, group II (K1, K4, K5, K7, K12, K92...)	
Haemolysins and haemagglutinins				
NRG857_06035	<i>clyA</i>	95	cytolysin, cell lysis	EPEC
NRG857_01335	<i>tsh</i>	78	temperature-sensitive hemagglutinin of avian <i>E. coli</i> , autotransporter	APEC
Other				
NRG857_00835	<i>htrA/degP</i>	97	stress protein, serine endoprotease	common
NRG857_02540	<i>ompT</i>	99	outer membrane protein 3b, other name: protease VII	common
NRG857_02570	<i>ibeB</i>	88	invasion gene locus (penetration of brain microvascular endothelial cells), putative resistance protein, putative outer membrane lipoprotein of copper ion antiporter	common
NRG857_04350	<i>ompA</i>	89	outer membrane protein (OMPA or OMPII)	common
NRG857_05660	<i>iss2</i>	100	gene for increased serum survival (similar to bacteriophage lambda Bor)	common
NRG857_07375	<i>gadB</i>	98	glutamate decarboxylase B, isozyme (amino acid catabolism and metabolism)	common
NRG857_11240	<i>ompC</i>	100	outer membrane protein	common
NRG857_13905	<i>malX</i>	94	maltose and glucose-specific IIABC component, pathogenicity island associated	UPEC
NRG857_15695	<i>nlpl</i>	100	lipoprotein	common
NRG857_17475	<i>gadA</i>	99	glutamate decarboxylase A, isozyme (amino acid catabolism and metabolism)	common
NRG857_19245	<i>dsbA</i>	100	oxidoreductase, thiol/disulfide interchange protein dsbA	common
NRG857_21885	<i>ibeA</i>	91	Invasion protein, <i>E. coli</i> invasion of the blood-brain barrier, other name: <i>ibe10</i>	MENEC
NRG857_30012	<i>iroD</i>	99	siderophore	common
NRG857_30013	<i>iroE</i>	93	siderophore	common
NRG857_30015	<i>iroN</i>	97	siderophore	common
NRG857_30235	<i>lutA</i>	95	cloacin DF13/aerobactin outer membrane receptor protein	common
NRG857_30237	<i>lucD</i>	96	gene of the aerobactin operon, first product of the aerobactin biosynthesis pathway	common
Other				
NRG857_30184	<i>traT</i>	84	complement resistance protein	common
NRG857_30283	<i>ompT</i>	76	outer membrane protein 3b, other name: protease VII	common
NRG857_30309	<i>iss2</i>	100	gene for increased serum survival (similar to Bacteriophage lambda Bor)	common
Antimicrobial resistance				
NRG857_30085	<i>blaTEM</i>	94	ampicillin	common
NRG857_30067	<i>tetC</i>	71	tetracycline	common
NRG857_30068	<i>tetA</i>	91	tetracycline	common
NRG857_30075	<i>catI</i>	100	chloramphenicol	common
NRG857_30100	<i>dhfrI</i>	99	trimethoprim	common
NRG857_30095	<i>sullI</i>	93	sulfonamides	common
NRG857_30104	<i>sull</i>	100	sulfonamides	common

La première piste repose sur l'analyse *in vitro* de la résistance à l'acidité des souches AIEC comparées à une souche non invasive *E. coli* K12. Elle se base sur une observation faite avec l'équipe de Monsieur FLAHAUT de l'Université d'Artois qui a montré l'expression de deux protéines HdeA et HdeB par la souche *E. coli* invasive, AIEC LF82. Cette observation était plausible du fait notamment de l'aptitude du pathovar AIEC à survivre et à se répliquer à l'intérieur du phagolysosome, échappant ainsi au phénomène de phagocytose.

La spectrométrie de masse a ainsi permis d'identifier deux pics spécifiques permettant de différencier la souche *E. coli* K12 non invasive du pathovar AIEC LF82. Ces deux pics, retrouvés chez le pathovar AIEC LF82, correspondent à l'expression de deux protéines: HdeA et HdeB (Figure 29).

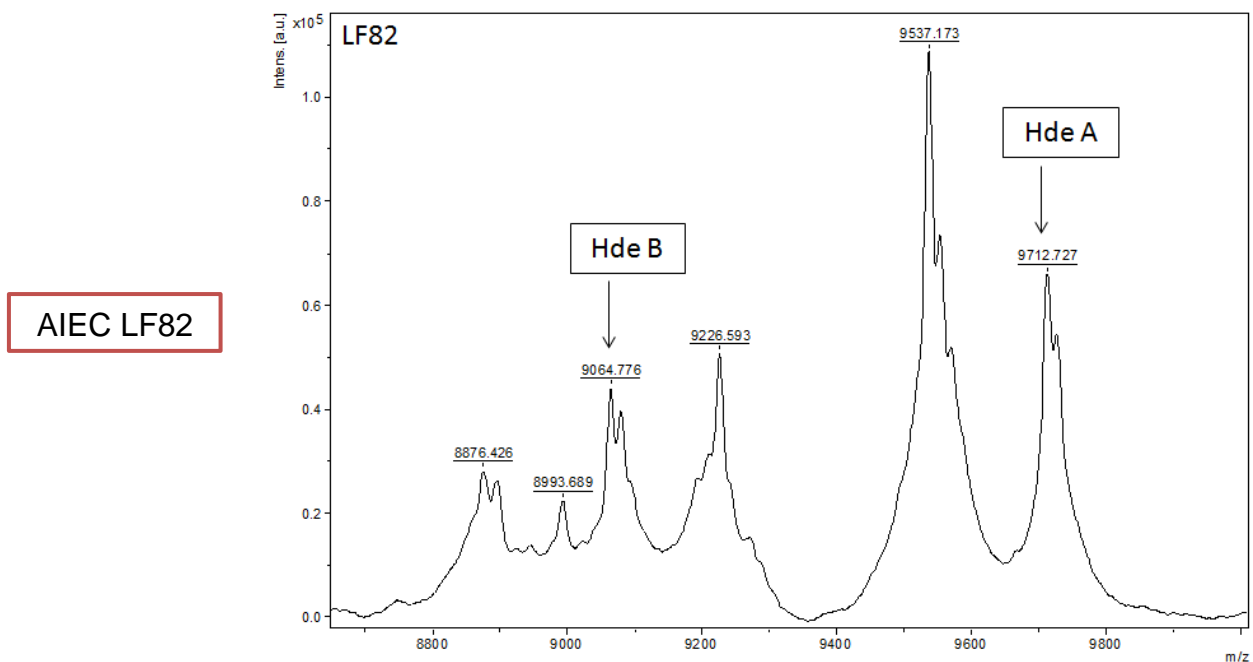


Figure 29: Profil spectrométrique du pathovar AIEC LF82 : expression de deux protéines spécifiques HdeA en position 9712,727 et HdeB en position 9067,776.

HdeA et HdeB correspondent à des protéines de résistance de l'acidité. La littérature scientifique décrit que de nombreux agents pathogènes entériques survivent à l'acidité de l'estomac avant d'infecter la muqueuse intestinale où le pH luminal atteint la neutralité. Cette capacité des bactéries à résister à un environnement acide laisse

donc supposer un lien entre l'expression de ces protéines et la virulence des bactéries¹³⁹

Ainsi, nous avons voulu essayer de comprendre pourquoi la souche LF82 exprimait ces protéines et non la K12 et si ces protéines pouvaient constituer un marqueur spécifique d'identification du pathovar AIEC.

Pour répondre à cette problématique, le rôle de HdeA et HdeB est évalué indirectement *in vitro* en réalisant une cinétique de croissance bactérienne à différents pH (acidité à neutralité) sur *E. coli* K12 (cette souche n'exprimant pas les protéines HdeA et HdeB par technique spectrométrique), et sur des souches AIEC (% invasion AIEC 07074=1.5825 ; % invasion AIEC 06283=0.253 ; % invasion AIEC 06254=2.163) isolées de patients atteints de la MC dont la souche de référence AIEC LF82.

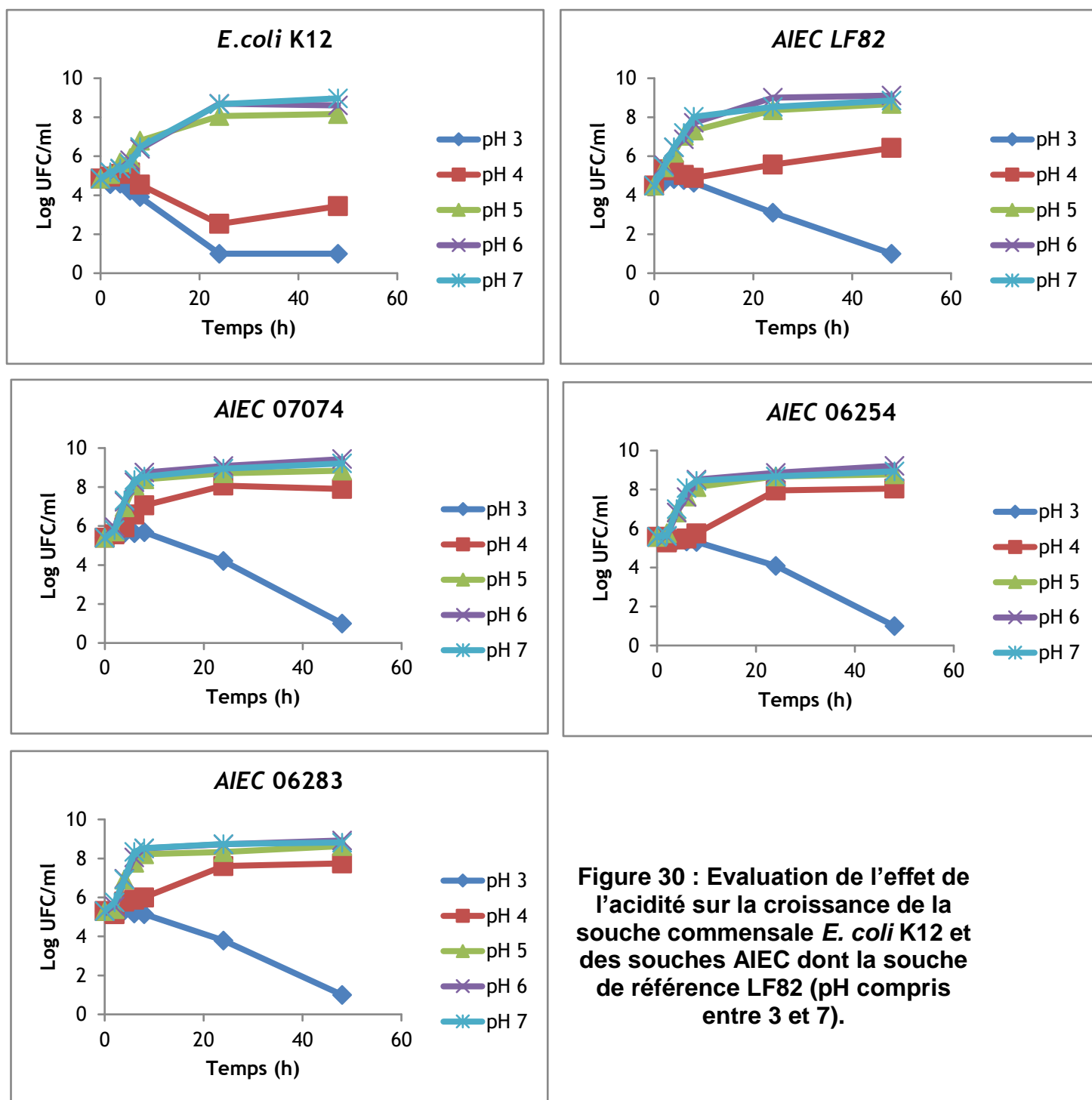


Figure 30 : Evaluation de l'effet de l'acidité sur la croissance de la souche commensale *E. coli* K12 et des souches AIEC dont la souche de référence LF82 (pH compris entre 3 et 7).

Le profil des courbes de croissance bactérienne est similaire entre la souche *E. coli* non invasive et les souches AIEC (Figure 30) :

- A pH très acide (pH 3), l'ensemble des souches *E. coli* semblent montrer une résistance à l'acidité pendant quelques heures (population bactérienne qui passe de 5-6 à environ 4-5 log UFC/mL après 6h de contact dans un milieu de

culture très acide). Le seuil de détection des *E. coli* est néanmoins atteint à partir de 24h de contact des bactéries avec le milieu de culture acide pour la K12 et à partir de 48h pour les souches AIEC.

- A pH acide (pH 4), la population bactérienne chute pour la souche *E. coli* K12 passant de 4 à environ 2 log UFC/mL à 6 et 24h de contact respectivement. La population bactérienne accroit à 48h de contact (4 log UFC/mL). Dans le cas des souches AIEC, le profil de cinétique bactérienne se caractérise par une croissance exponentielle bactérienne (population bactérienne passant approximativement de 6 à 8 log UFC/mL entre 6 et 48h d'incubation).
- A pH acide (pH 5), l'ensemble des souches *E. coli* résistent à l'acidité du milieu de culture et s'y développent. La cinétique de croissance bactérienne en condition acide (pH 5) suit les mêmes phases que celle en condition neutre (pH 7). Ces phases sont caractérisées par une phase de latence, une phase exponentielle et une phase stationnaire.

L'autre piste a consisté à étudier les facteurs de virulence aux antibiotiques des AIEC isolés de patients atteints de la MC par rapport à une souche commensale non invasive, la souche *E. coli* K12.

L'objectif de cette étude préliminaire a consisté à étudier la sensibilité des isolats AIEC provenant de matières fécales des patients atteints de la MC. 22 de ces souches ont été obtenues et caractérisées par une étude antérieure au laboratoire (référéncées sous l'appellation C), les autres sont issues de notre analyse (référéncées sous l'appellation OR).

La sensibilité des AIEC isolés de patients atteints de la MC a été testée en réalisant un test de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur différentes familles d'antibiotiques. Dans ce test, la détermination de la CMI a été réalisée sur 54 souches AIEC isolées de patients atteints de la MC dont la souche de référence AIEC LF82 et comparée à un témoin négatif, *E. coli* K12 non invasive (Tableau 14). Afin de valider la méthodologie, un étalon interne *E. coli* ATCC 25922 dont l'activité antibactérienne est connue est testé (recommandation de l'EUCAST).

TABLEAU 14: Caractéristiques des souches investiguées dans cette étude.

Numéros des souches	Références	Score d'invasion (%)	Numéros des souches	Références	Score d'invasion (%)	Numéros des souches	Références	Score d'invasion (%)
1	C 223-2	2.09	20	C 190-3	0.1688	39	OR99-9	0,198
2	C 215-4	0.315	21	C 102-7	0.2342	40	OR4-3	0,864
3	C 45-1	0.4675	22	C 133-1	0.2475	41	OR9-1	0,621
4	C 55-8A	4.425	23	OR4-2	0,241	42	OR9-2	0,105
5	C 42-3	0.193	24	OR4-6	2,577	43	OR9-3	0,321
6	C 100-11A	0.6325	25	OR4-8	0,548	44	OR9-8	0,193
7	C 71-5	0.2388	26	OR4-9	0,677	45	OR9-9	0,831
8	C 44-2	0.595	27	OR4-10	0,179	46	OR9-11	0,119
9	C 187-13	0.6675	28	OR9-10	0,332	47	OR10-7	0,114
10	C 97-1	0.1173	29	OR10-2	0,527	48	OR17-1	0,485
11	C 82-5	0.7325	30	OR71-1	0,511	49	OR17-2	0,304
12	C 99-2	0.1613	31	OR71-2	1,756	50	OR17-5	0,109
13	C 61-2	0.1144	32	OR71-4	0,468	51	OR17-10	0,347
14	C 231-2	0.141	33	OR71-8	0,626	52	OR44-1	0,203
15	C 183-12	0.2117	34	OR71-9	0,468	53	OR99-2	0,117
16	C 39-4	0.2334	35	OR71-10	0,198	54	AIEC LF82	>0.1
17	C 98-1	0.1439	36	OR71-11	0,196	60	<i>E. coli</i> K12	<0.1
18	C 107-10	0.1975	37	OR75-22	0,416			
19	C 81-1	0.285	38	OR85-15	0,220			

Les résultats sont présentés sous forme de nuage de point récapitulatif, pour chaque antibiotique, la valeur de la CMI des 54 souches AIEC isolées de patients atteints de la MC dont la souche de référence AIEC LF82 comparée à un témoin négatif, *E. coli* K12 non invasive. Les résultats exposés ciblent les différentes classes d'ATB (β -lactamines, céphalosporines, aminosides, macrolides, rifamycines, fluoroquinolones, et autres).

La Figure 31 semble montrer une répartition aléatoire des valeurs de CMI des souches AIEC et de la souche *E. coli* non invasive, K12 aux différentes classes d'antibiotiques. Ainsi, la résistance aux antibiotiques ne semble pas être un critère d'identification des AIEC.

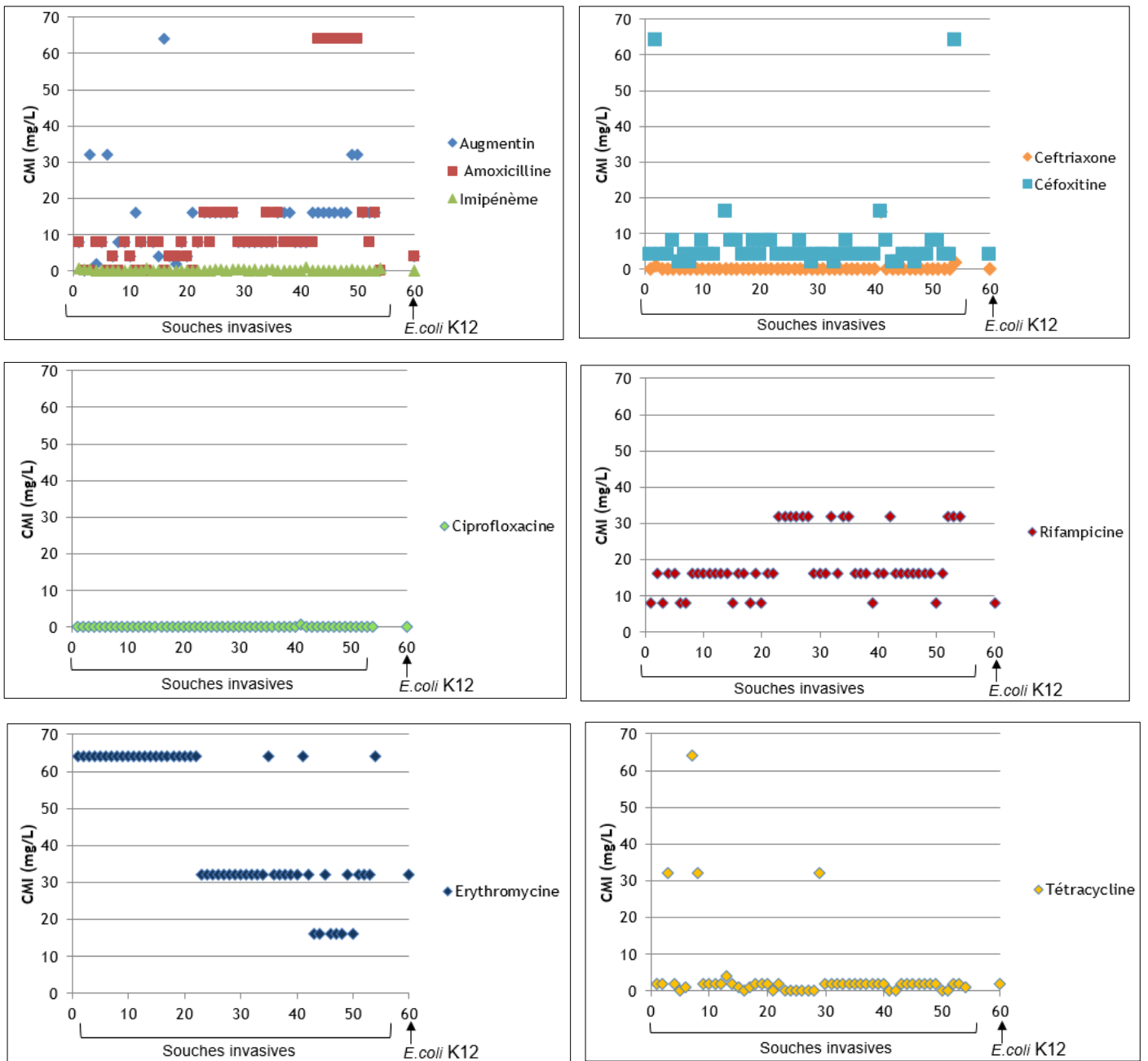
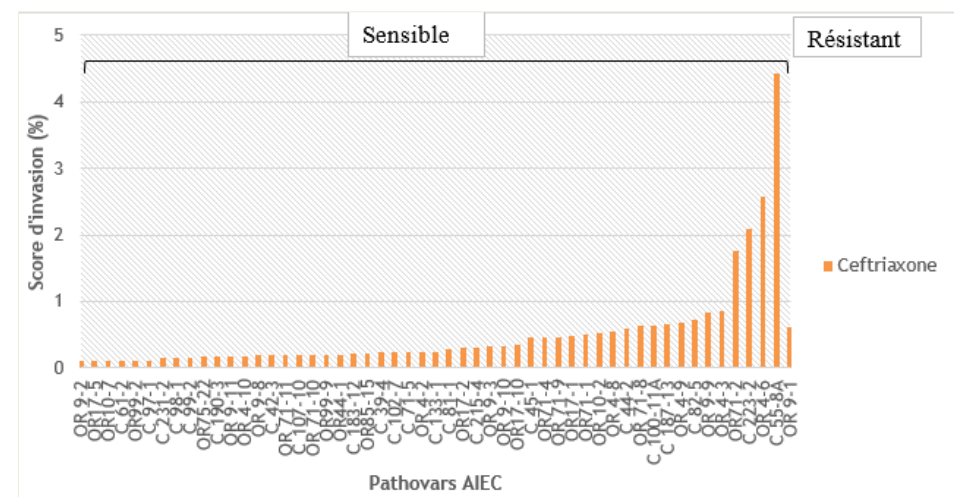
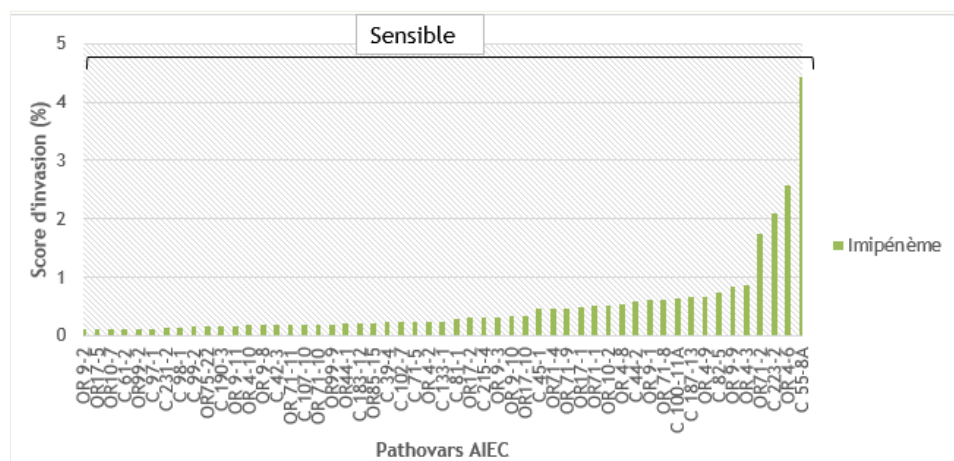
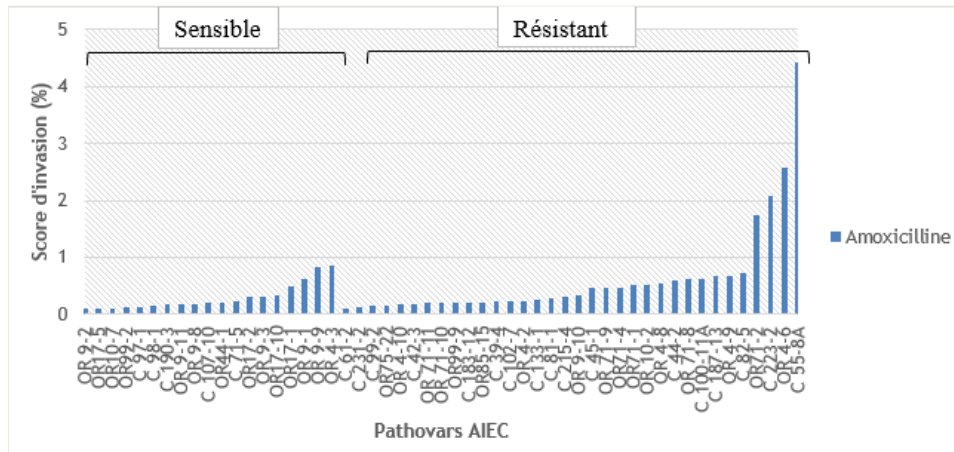


Figure 31 : Comparaison de la CMI de différents ATB des souches AIEC avec une souche commensale non invasive.

Une comparaison des % d'invasion des souches AIEC isolées de patients atteints de MC (n=53) a été investiguée en fonction de leur profil de sensibilité aux ATB.

La Figure 32 montre le % d'invasion des 53 AIEC isolés chez les patients atteints de la MC en fonction de leur sensibilité (S) ou résistance (R) aux différents ATB testés.



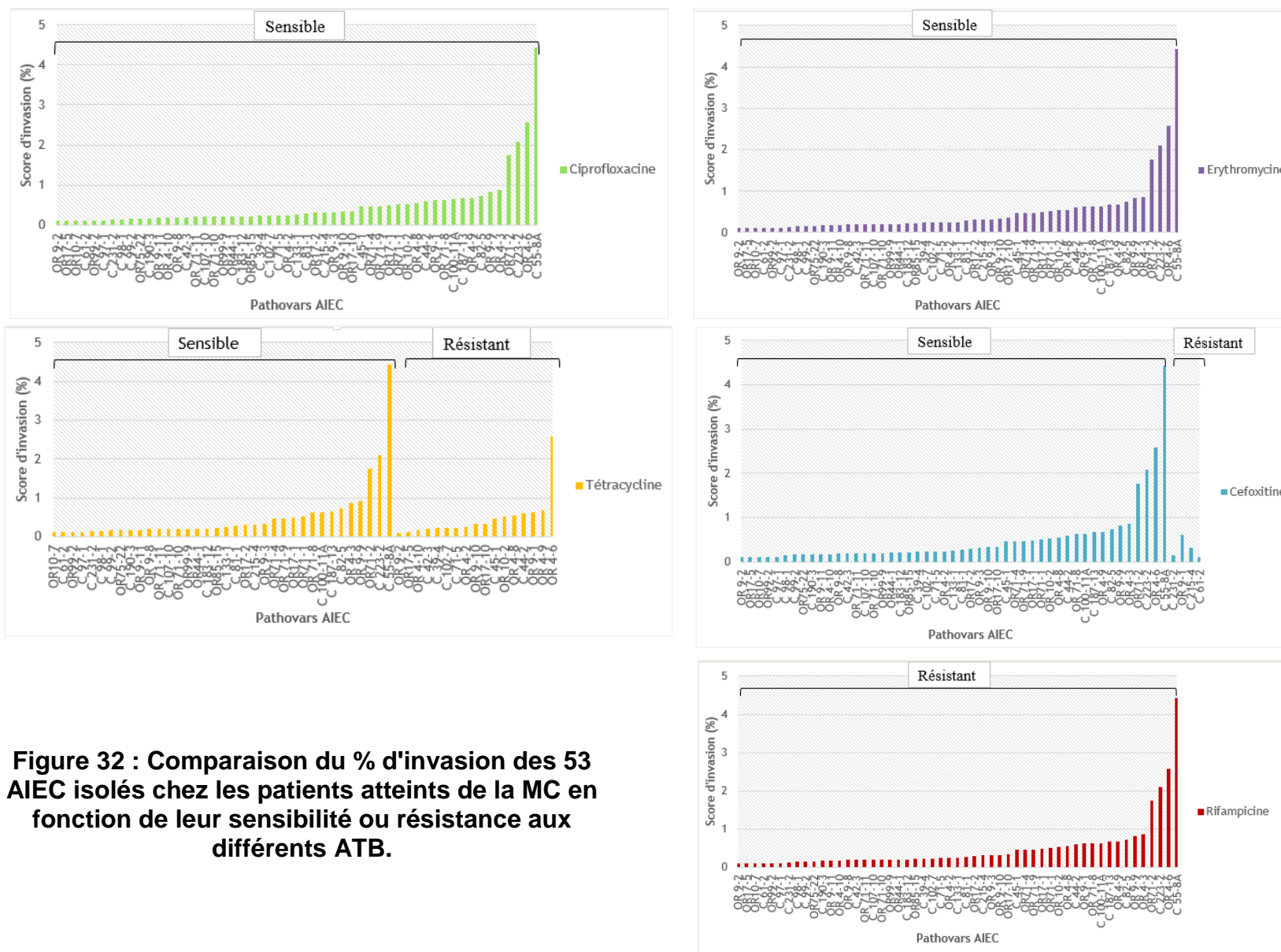


Figure 32 : Comparaison du % d'invasion des 53 AIEC isolés chez les patients atteints de la MC en fonction de leur sensibilité ou résistance aux différents ATB.

Ces graphiques confirment bien l'absence de corrélation entre les valeurs de CMI avec le % d'invasion des AIEC. En effet, une valeur élevée de CMI ne se traduit pas du tout par un fort pourcentage d'invasion et vice versa.

La résistance aux antibiotiques ne semble pas être corrélée à la virulence des souches AIEC. Il ne s'agit donc pas d'un bon marqueur.

Une étude préliminaire d'étude de la capacité de formation de biofilm, qui constitue un facteur de virulence et de pathogénicité chez les bactéries, a été déterminée sur un panel plus restreint de souches AIEC (n=31 AIEC isolés des matières fécales de patients atteints de la MC) et comparée avec leur % d'invasion (Tableau 15). Après coloration par le crystal violet, une lecture des absorbances est effectuée à une $\lambda=570 \text{ nm}^{140}$.

TABLEAU 15 : Caractéristiques des souches investiguées dans cette étude :

Numéros des souches	Références	% invasion	Numéros des souches	Références	% invasion
1	OR17-5	0,109	17	OR 9-8	0,193
2	OR 4-10	0,179	18	OR 71-10	0,198
3	OR 71-11	0,196	19	OR99-9	0,198
4	OR44-1	0,203	20	OR85-15	0,22
5	OR 4-2	0,241	21	OR 9-3	0,321
6	OR17-2	0,304	22	OR 9-10	0,332
7	OR17-1	0,485	23	OR17-10	0,347
8	OR71-1	0,511	24	OR75-22	0,4164
9	OR 4-8	0,548	25	OR71-4	0,468
10	OR 71-8	0,626	26	OR 71-9	0,468
11	OR 4-9	0,677	27	OR 10-2	0,527
12	OR 4-6	2,577	28	OR 9-1	0,621
13	OR 9-2	0,105	29	OR 9-9	0,831
14	OR10-7	0,114	30	OR 4-3	0,864
15	OR99-2	0,117	31	OR71-2	1,756
16	OR 9-11	0,119			

La Figure 33 montre la comparaison entre le % d'invasion de 31 AIEC isolés chez les patients atteints de la MC en fonction de leur capacité ou non à former un biofilm.

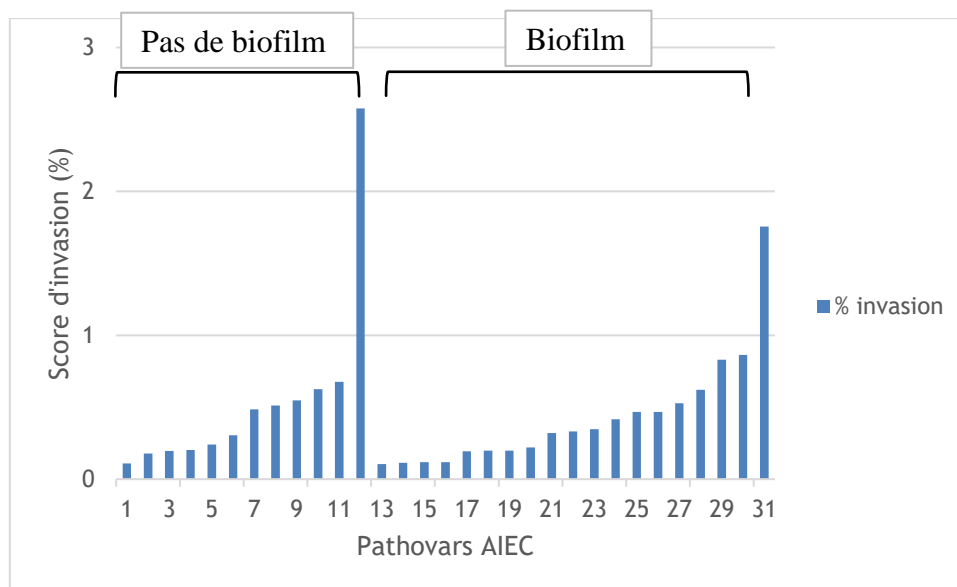


Figure 33 : Comparaison du % d'invasion des 31 AIEC isolés chez les patients atteints de la MC en fonction de leur capacité à former un biofilm.

La Figure 33 ne montre aucune corrélation entre le % d'invasion des AIEC avec leur capacité à former un biofilm. En effet, certaines souches ont un % d'invasion très élevé mais ne sont pas capables de former un biofilm (souches 10, 11 et 12) et inversement, certaines souches présentent un très faible pourcentage d'invasion et sont très adhérentes au support (souches 29, 30 et 31 par exemple).

Bien que la capacité à former un biofilm correspond à l'une des caractéristiques pathologique fréquemment retrouvé chez le pathovar AIEC, ce trait n'est néanmoins pas spécifique des AIEC. En effet, Martinez Medina Margarita et al. a montré que des souches d'origines intestinales non AIEC présentaient également cette capacité à former un biofilm (17 AIEC/27 et 9/38 non AIEC)⁹¹. En addition à ces résultats, nous avons pu montrer par nos travaux qu'il n'existe pas de corrélations entre le score d'invasion des souches AIEC et leur capacité de former un biofilm, à savoir qu'une souche fortement invasive n'a pas forcément la capacité de former un biofilm et inversement.

La capacité à exprimer des fimbriae, autre facteur de virulence, est évaluée sur les 31 AIEC comparée au témoin négatif et repose sur un test phénotypique (rouge congo)¹⁴¹.

Les 31 souches AIEC sont capables d'exprimer des fimbriae y compris le témoin négatif (*E. coli* K12 non invasif). Ainsi, l'expression de fimbriae ne constitue pas un marqueur d'identification spécifique des AIEC.

Ce travail nous a donc permis d'exploiter quelques pistes dans la recherche d'une nouvelle méthodologie d'identification des AIEC et donc dans la recherche d'un marqueur spécifique des AIEC. Aucune des pistes ne s'est avérée exploitable.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES :

L'ensemble du travail effectué durant ce projet montre pour la toute première fois la détection de pathovar AIEC dans les matières fécales de patients atteints de MICI, aussi bien chez les patients atteints de la MC que chez les patients atteints de RCH. Une plus forte prévalence de ces souches invasives a été démontrée chez des individus en bonne santé, remettant ainsi en question la réelle implication du pathovar AIEC dans les MICI. Sur un total de 288 prélèvements de matières fécales d'une cohorte de patients et de sujets sains, des souches invasives ont été détectées à une fréquence de 33%, 2% et 51% respectivement chez les patients atteints de la MC, chez les patients atteints de RCH et chez les sujets sains. A l'issue de ces résultats montrant un fort portage des AIEC chez des sujets en bonne santé, les AIEC seraient plutôt à reconsidérer comme des pathobionts. Dans notre travail, nous avons également pu démontrer une quantité plus élevée des souches AIEC chez les patients atteints de RCH que chez les témoins, ceci probablement dû à la faible variabilité chez ce groupe de patients. Aucune différence significative n'a été relevée chez les patients atteints de la MC par rapport aux témoins sains. Dans notre étude, nous avons également pu démontrer pour la première fois que le pathovar AIEC, lorsqu'il est présent, peut être en dominance ou en sous-dominance par rapport à la flore *E. coli*, et cette analyse a été établie dans les 3 groupes. Par rapport à la flore *E. coli*, ce pathovar représente en moyenne entre 20 à 30% chez les patients atteints de MICI et chez les sujets sains, sans différences significatives entre ces groupes. Et concernant l'invasion, nous avons pu soulever aucune différence significative des scores d'invasion des isolats AIEC des patients atteints de MICI, comparativement aux témoins sains, les souches AIEC des patients ne sont ainsi pas plus invasives que celles des sujets sains.

Bien le pathovar AIEC possède un phénotype adhérent et invasif, et ne présente pas les caractéristiques associés aux gènes de virulence des autres pathovars intestinaux d' *E. coli* bien décrits, il est de sérologie et de phénotypes très divers, ce qui complique d'éventuelles corrélations entre ce pathovar et les MICI⁹⁶. Dans l'étude de la recherche de souches AIEC au sein de la collection ECOR, nous avons pu montrer une prévalence de ce pathovar AIEC de 21% sur l'ensemble de cette collection. Une prévalence des AIEC

estimée à 24% et 19% a été relevée respectivement pour les souches d'origine humaine et les souches d'origine animale. Ces résultats, en concordance avec ceux obtenus dans la cohorte des sujets sains, nous apportent une donnée supplémentaire à notre étude, et concernent notamment le réservoir des AIEC.

Actuellement, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont en cours de recherche dont l'objectif principal est de cibler le pathovar AIEC potentiellement impliqué dans les MICI. Les stratégies consistent donc à moduler la flore bactérienne via la nutrition, les traitements antibiotiques, les probiotiques, la transplantation fécale et la phagothérapie⁹⁸.

Ces données restent encore en cours d'étude avec notamment quelques données manquantes sur la survie et la réplication des souches *E. coli* invasives en macrophages. Sur un total de 80 souches *E. coli* révélées comme invasives *in vitro* sur le modèle cellulaire I-407, une vingtaine de souches restent à étudier quant à leur capacité de survie et de réplication en macrophages.

Bien qu'avec nos travaux de recherche qui ont permis de montrer pour la première fois une détection de souches répondant aux caractéristiques des AIEC au niveau luminal aussi bien chez les patients MICI que chez les sujets sains, de nombreuses questions sur ce pathovar AIEC restent encore en suspens.

Ainsi, en perspective, pour ce travail de recherche, différentes pistes sont envisagées afin de mieux comprendre l'implication des AIEC dans les MICI.

- A court terme, l'une des perspectives repose sur la caractérisation phylogénétique des AIEC et l'évaluation du pouvoir inflammatoire de ces pathovars par des marqueurs spécifiques de l'inflammation (TNF, IL-1, IL-6).
- Les données cliniques des patients atteints de MICI (tabagisme, chirurgie, traitement, localisation de la pathologie et son activité) seront analysées et reliées aux données bactériologiques.
- A plus long terme, différentes études devraient être menées afin de répondre aux points suivants :

- Prévalence des AIEC au niveau de différents segments intestinaux (côlon, iléon, rectum, fèces) chez les patients atteints de MICI.



Etude et suivi de la détection des AIEC sur différents prélèvements.

Protocole de recherche clinique (CHRU Lille).

- Empreinte génétique et/ou moléculaire spécifique des AIEC



Recherche d'une « empreinte » génétique et/ou moléculaire des pathovars AIEC

Séquençage

- Homogénéité ou hétérogénéité des AIEC chez les patients atteints de MICI



Caractérisation des pathovars AIEC chez un même patient

RFLP / Sérotypage/
Phylotypage

- Recherche du réservoir et habitat des AIEC



Recherche des AIEC chez des animaux développant une colite.

Collaboration avec le centre de cancérologie vétérinaire Oncovet (Lille)

D'autres perspectives à ce travail peuvent être envisagées afin de mieux juger de l'implication du pathovar AIEC dans les MICI.

Ces perspectives concernent par exemple l'évolution de la colonisation des AIEC chez les patients atteints de MICI en période de crise et après traitement chirurgical.

L'étude du réservoir naturel des AIEC demeure également une piste à étudier, avec comme hypothèse principale les facteurs environnementaux (eaux et sols enrichis en engrais et pesticides).

L'identification d'un biomarqueur et de dépistage de positivité des AIEC et/ou de la positivité de la MC reste également une piste à exploiter, au même titre que la recherche d'un marqueur spécifique des AIEC.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

1. Palmela, C. *et al.* Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut* (2018)
2. Digestscience. Maladie de Crohn, rectocolite hémorragique, maladie coeliaque, syndrome du côlon irritable.
3. Giniès, J.-L. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). *Psychopathologie en service de pédiatrie* 384–391 (2011).
4. Mas-Moya, J. & Singhi, A. D. The gross pathology of inflammatory bowel disease. *Diagnostic Histopathology* **21**, 261–266 (2015).
5. Gajendran, M., Loganathan, P., Catinella, A. P. & Hashash, J. G. A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Disease-a-Month* **64**, 20–57 (2018).
6. Taleban, S., Colombel, J.-F., Mohler, M. J. & Fain, M. J. Inflammatory Bowel Disease and the Elderly: A Review. *Journal of Crohn's and Colitis* **9**, 507–515 (2015).
7. Colombel, J.-F. & Mahadevan, U. Inflammatory Bowel Disease 2017: Innovations and Changing Paradigms. *Gastroenterology* **152**, 309–312 (2017).
8. Fumery, M., Dauchet, L., Vignal, C. & Gower-Rousseau, C. Epidemiology, risk factors and factors associated with disabling course in inflammatory bowel disease. *Rev Prat* **64**, 1210–1215 (2014).
9. Declercq, C. *et al.* Mapping of inflammatory bowel disease in northern France: Spatial variations and relation to affluence: *Inflammatory Bowel Diseases* **16**, 807–812 (2010).

10. Ng, S. C. *et al.* The Worldwide Incidence and Prevalence of Inflammatory Bowel Disease in the 21st Century: A Systematic Review of Population-Based Studies. *Gastroenterology* **152**, S970–S971 (2017).
11. Bernstein, C. N. *et al.* The Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease in Canada: A Population-Based Study. *The American Journal of Gastroenterology* **101**, 1559–1568 (2006).
12. Thompson, N. P., Fleming, D. M., Charlton, J., Pounder, R. E. & Wakefield, A. J. Patients consulting with Crohn's disease in primary care in England and Wales. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **10**, 1007–1012 (1998).
13. Wilson, J. *et al.* High incidence of inflammatory bowel disease in Australia: A prospective population-based Australian incidence study: *Inflammatory Bowel Diseases* **16**, 1550–1556 (2010).
14. Bengtson, M.-B. *et al.* Familial aggregation in Crohn's disease and ulcerative colitis in a Norwegian population-based cohort followed for ten years. *Journal of Crohn's and Colitis* **3**, 92–99 (2009).
15. Chan, D., Kumar, D. & Mendall, M. What is known about the mechanisms of dietary influences in Crohn's disease? *Nutrition* **31**, 1195–1203 (2015).
16. Lewis, J. D. & Abreu, M. T. Diet as a Trigger or Therapy for Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* **152**, 398–414 (2017).
17. Dutta, A. K. Influence of environmental factors on the onset and course of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* **22**, 1088 (2016).
18. Molodecky, N. A. & Kaplan, G. G. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 339–346 (2010).

19. Karwowski, C. A., Keljo, D. & Szigethy, E. Strategies to improve quality of life in adolescents with inflammatory bowel disease: *Inflammatory Bowel Diseases* **15**, 1755–1764 (2009).
20. Levesque, B. G. *et al.* Converging Goals of Treatment of Inflammatory Bowel Disease From Clinical Trials and Practice. *Gastroenterology* **148**, 37–51 (2015).
21. De Mattos, B. R. R. *et al.* Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments. *Mediators of Inflammation* **2015**, 1–11 (2015).
22. Hart, A. L. & Ng, S. C. Crohn's disease. *Medicine* **43**, 282–290 (2015).
23. Pithadia, A. B. & Jain, S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol Rep* **63**, 629–642 (2011).
24. Vavricka, S. R. *et al.* Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease: *Inflammatory Bowel Diseases* **21**, 1982–1992 (2015).
25. Whitehead, W. E. & Drossman, D. A. Validation of Symptom-Based Diagnostic Criteria for Irritable Bowel Syndrome: A Critical Review. *The American Journal of Gastroenterology* **105**, 814–820 (2010).
26. Stange, E. F. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* **55**, i1–i15 (2006).
27. Van Assche, G. *et al.* The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's and Colitis* **4**, 7–27 (2010).
28. Tontini, G. E. Differential diagnosis in inflammatory bowel disease colitis: State of the art and future perspectives. *World Journal of Gastroenterology* **21**, 21 (2015).
29. Roblin, X., Cavaille, A., Clavel, L. & Paul, S. Intérêt des biomarqueurs dans la prise en charge des MICI. *La Presse Médicale* **43**, 66–73 (2014).

30. Rameshshanker, R. Endoscopy in inflammatory bowel disease when and why. *World Journal of Gastrointestinal Endoscopy* **4**, 201 (2012).
31. Jentzer, A., Depincé-Berger, A.-E., Genin, C., Roblin, X. & Paul, S. Nouveaux marqueurs diagnostiques et pronostiques des maladies chroniques inflammatoires intestinales. *Revue Francophone des Laboratoires* **2016**, 49–56 (2016).
32. Sura, R., Colombel, J.-F. & Van Kruiningen, H. J. Lymphatics, tertiary lymphoid organs and the granulomas of Crohn's disease: an immunohistochemical study: Lymphatics and Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **33**, 930–939 (2011).
33. Turck, D. & Gottrand, F. Gastroentérologie pédiatrique. (2016).
34. Klotz, C. *et al.* Rectocolite hémorragique : conduite diagnostique et prise en charge thérapeutique. *La Presse Médicale* **44**, 144–149 (2015).
35. Politis, D. S., Katsanos, K. H., Tsianos, E. V. & Christodoulou, D. K. Pseudopolyps in inflammatory bowel diseases: Have we learned enough? *World Journal of Gastroenterology* **23**, 1541 (2017).
36. Feuerstein, J. D. & Cheifetz, A. S. Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Mayo Clinic Proceedings* **92**, 1088–1103 (2017).
37. Sales-Campos, H. *et al.* Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **48**, 96–107 (2015).
38. Yamamoto-Furusho, J. Pharmacogenetics in inflammatory bowel disease: understanding treatment response and personalizing therapeutic strategies. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine* **10**, 197–204 (2017).

39. Hvas, C. L., Bendix, M., Dige, A., Dahlerup, J. F. & Agnholt, J. Current, experimental, and future treatments in inflammatory bowel disease: a clinical review. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 1–15 (2018).
40. Surlin, V., Copaescu, C. & Saftoiu, A. An Update to Surgical Management of Inflammatory Bowel Diseases. in *Inflammatory Bowel Disease* (2012).
41. Seksik, P. Gut microbiota and IBD. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* **34**, S44–S51 (2010).
42. Smith, E. J., Thompson, A. P., O’Driscoll, A. & Clarke, D. J. Pathogenesis of adherent–invasive *Escherichia coli*. *Future Microbiology* **8**, 1289–1300 (2013).
43. Khalili, H. *et al.* The role of diet in the aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* (2018).
44. Sobczak, M. *et al.* Current overview of extrinsic and intrinsic factors in etiology and progression of inflammatory bowel diseases. *Pharmacological Reports* **66**, 766–775 (2014).
45. Kannengiesser, K., Maaser, C. & Kucharzik, T. Molecular pathogenesis of inflammatory bowel disease: relevance for novel therapies. *Personalized Medicine* **5**, 609–626 (2008).
46. Kökten, T., Hansmannel, F., Melhem, H. & Peyrin-Biroulet, L. Physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l’intestin (MICI). *HEGEL - HEpato-GastroEntérologie Libérale* (2016).
47. Rahmouni, O., Dubuquoy, L., Desreumaux, P. & Neut, C. Microbiote intestinal et développement des maladies inflammatoires chroniques de l’intestin. *médecine/sciences* **32**, 968–973 (2016).

48. Kaplan, G. G. & Ng, S. C. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **152**, 313–321 (2017).
49. Kostic, A. D., Xavier, R. J. & Gevers, D. The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology* **146**, 1489–1499 (2014).
50. Christian Felley. Les apports de NOD2/CARD15 dans la prise en charge de la maladie de Crohn. *Hépto-Gastro & Oncologie Digestive* **13**, 429–432 (2006).
51. Boyapati, R., Satsangi, J. & Tzer Ho, G. Pathogenesis of Crohn's disease. *F1000Prime Reports* **7**, 1–18 (2015).
52. Strober, W. & Watanabe, T. NOD2, an intracellular innate immune sensor involved in host defense and Crohn's disease. *Mucosal Immunology* **4**, 484–495 (2011).
53. Kabat, A. M. *et al.* The autophagy gene *ATG16L1* differentially regulates T_{reg} and T_H2 cells to control intestinal inflammation. *eLife* **5**, (2016).
54. Shih, D. Q., Targan, S. R. & McGovern, D. Recent advances in IBD pathogenesis: genetics and immunobiology. *Curr Gastroenterol Rep* **10**, 568–575 (2008).
55. Hviid, A., Svanstrom, H. & Frisch, M. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. *Gut* **60**, 49–54 (2011).
56. Shaw, S. Y., Blanchard, J. F. & Bernstein, C. N. Association Between the Use of Antibiotics and New Diagnoses of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *The American Journal of Gastroenterology* **106**, 2133–2142 (2011).
57. Celiberto, L. S. *et al.* Inflammatory bowel disease and immunonutrition: novel therapeutic approaches through modulation of diet and the gut microbiome. *Immunology* **155**, 36–52 (2018).

58. Hou, J. K., Abraham, B. & El-Serag, H. Dietary Intake and Risk of Developing Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review of the Literature. *The American Journal of Gastroenterology* **106**, 563–573 (2011).
59. Levine, A., Sigall Boneh, R. & Wine, E. Evolving role of diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Gut* **67**, 1726–1738 (2018).
60. Dixon, L. J., Kabi, A., Nickerson, K. P. & McDonald, C. Combinatorial Effects of Diet and Genetics on Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis: *Inflammatory Bowel Diseases* **21**, 912–922 (2015).
61. Tamboli, C. P., Neut, C., Desreumaux, P. & Colombel, J. F. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* **53**, 1–4 (2004).
62. Sokol, H. *et al.* Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* **66**, 1039–1048 (2017).
63. Alhagahmad, M. H., Day, A. S., Lemberg, D. A. & Leach, S. T. An overview of the bacterial contribution to Crohn disease pathogenesis. *Journal of Medical Microbiology* **65**, 1049–1059 (2016).
64. Marteau, P. & Doré, J. *Le microbiote intestinal: un organe à part entière*. (John Libbey eurotext, 2017).
65. Jandhyala, S. M. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology* **21**, 8787–8803 (2015).
66. Polanco Allué, I. Microbiota and gastrointestinal diseases. *Anales de Pediatría* **83**, 443.e1–443.e5 (2015).
67. Reinoso Webb, C., Koboziev, I., Furr, K. L. & Grisham, M. B. Protective and pro-inflammatory roles of intestinal bacteria. *Pathophysiology* **23**, 67–80 (2016).
68. Bourlioux, P. Actualité du microbiote intestinal. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **72**, 15–21 (2014).

69. Rodríguez, J. M. *et al.* The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health & Disease* **26**, 1–17 (2015).
70. Bull, M. J. & Plummer, N. T. Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease. *Integr Med (Encinitas)* **13**, 17–22 (2014).
71. Gérard, P. & Bernalier-Donadille, A. Les fonctions majeures du microbiote intestinal. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* **42**, 28–36 (2007).
72. Wang, B., Yao, M., Lv, L., Ling, Z. & Li, L. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering* **3**, 71–82 (2017).
73. Khanna, S. & Raffals, L. E. The Microbiome in Crohn's Disease. *Gastroenterology Clinics of North America* **46**, 481–492 (2017).
74. O'Hara, A. M. & Shanahan, F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports* **7**, 688–693 (2006).
75. Roda, G. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology* **16**, 4264–71 (2010).
76. Zhang, M. *et al.* Interactions between Intestinal Microbiota and Host Immune Response in Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Immunology* **8**, 1–13(2017).
77. Antoni, L. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* **20**, 1165–79 (2014).
78. Becker, C., Neurath, M. F. & Wirtz, S. The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *ILAR Journal* **56**, 192–204 (2015).
79. Cammarota, G. *et al.* The involvement of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: Potential for therapy. *Pharmacology & Therapeutics* **149**, 191–212 (2015).

80. Landers, C. J. *et al.* Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology* **123**, 689–699 (2002).
81. Barbut, F. & Joly, F. Le microbiote intestinal : équilibre et dysbiose. *HEPATO-GASTRO et Oncologie digestive* **17**, 511–520 (2010).
82. Lane, E. R., Zisman, T. & Suskind, D. The microbiota in inflammatory bowel disease: current and therapeutic insights. *Journal of Inflammation Research* **10**, 63–73 (2017).
83. Rutgeerts, P. *et al.* Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet* **338**, 771–774 (1991).
84. Nagao-Kitamoto, H. & Kamada, N. Host-microbial Cross-talk in Inflammatory Bowel Disease. *Immune Network* **17**, 1 (2017).
85. Kaakoush, N. O. *et al.* Microbial Dysbiosis in Pediatric Patients with Crohn's Disease. *Journal of Clinical Microbiology* **50**, 3258–3266 (2012).
86. Matsuoka, K. & Kanai, T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Seminars in Immunopathology* **37**, 47–55 (2015).
87. Buttó, L. F. & Haller, D. Dysbiosis in intestinal inflammation: Cause or consequence. *International Journal of Medical Microbiology* **306**, 302–309 (2016).
88. Willing, B. *et al.* Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease: *Inflammatory Bowel Diseases* **15**, 653–660 (2009).
89. 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. *The ISME Journal* **1**, 403–418 (2007).

90. Lopez-Siles, M. *et al.* Mucosa-associated *Faecalibacterium prausnitzii* and *Escherichia coli* co-abundance can distinguish Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease phenotypes. *International Journal of Medical Microbiology* **304**, 464–475 (2014).
91. 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: *Inflammatory Bowel Diseases* **15**, 872–882 (2009).
92. Martinez-Medina, M. & Garcia-Gil, L. J. *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *World J Gastrointest Pathophysiol.* **3**, 213–227 (2014).
93. Kotlowski, R., Bernstein, C. N., Sepehri, S. & Krause, D. O. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* **56**, 669–675 (2007).
94. Dreux, N. *et al.* Point Mutations in FimH Adhesin of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Enhance Intestinal Inflammatory Response. *PLoS Pathogens* **9**, e1003141 (2013).
95. Elliott, T. R. *et al.* Quantification and Characterization of Mucosa-Associated and Intracellular *Escherichia coli* in Inflammatory Bowel Disease: *Inflammatory Bowel Diseases* **19**, 2326–2338 (2013).
96. Gombošová, L. *et al.* Genes of intestinal *Escherichia coli* and their relation to the inflammatory activity in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Folia Microbiologica* **56**, 367–372 (2011).

97. Ahmed, I., Roy, B., Khan, S., Septer, S. & Umar, S. Microbiome, Metabolome and Inflammatory Bowel Disease. *Microorganisms* **4**, 1–19 (2016).
98. Shawki, A. & McCole, D. F. Mechanisms of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* **3**, 41–50 (2017).
99. Agus, A., Massier, S., Darfeuille-Michaud, A., Billard, E. & Barnich, N. Understanding Host-Adherent-Invasive *Escherichia coli* Interaction in Crohn's Disease: Opening Up New Therapeutic Strategies. *BioMed Research International* **2014**, 1–16 (2014).
100. Yang, Y., Liao, Y., Ma, Y., Gong, W. & Zhu, G. The role of major virulence factors of AIEC involved in inflammatory bowel disease—a mini-review. *Applied Microbiology and Biotechnology* **101**, 7781–7787 (2017).
101. Martinez-Medina, M., Garcia-Gil, J., Barnich, N., Wieler, L. H. & Ewers, C. Adherent-Invasive *Escherichia coli* Phenotype Displayed by Intestinal Pathogenic *E. coli* Strains from Cats, Dogs, and Swine. *Applied and Environmental Microbiology* 5813–5817 (2011).
102. Boudeau, J., Glasser, A. L., 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.* **67**, 4499–4509 (1999).
103. Wine, E., Ossa, J. C., Gray-Owen, S. D. & Sherman, P. M. Adherent-invasive *Escherichia coli*, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia. *BMC Microbiology* **9**, 1–11 (2009).

104. McPhee, J. B. *et al.* Host Defense Peptide Resistance Contributes to Colonization and Maximal Intestinal Pathology by Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **82**, 3383–3393 (2014).
105. Zhang, Y. *et al.* Identification of Candidate Adherent-Invasive *E. coli* Signature Transcripts by Genomic/Transcriptomic Analysis. *PLOS ONE* **10**, e0130902 (2015).
106. O'Brien, C. L. *et al.* Comparative genomics of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Gut* (2016).
107. Darfeuille-Michaud, A. *et al.* High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* **127**, 412–421 (2004).
108. Hold, G. L. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years? *World Journal of Gastroenterology* **20**, 1192–2010 (2014).
109. Simpson, K. W. *et al.* Adherent and Invasive *Escherichia coli* Is Associated with Granulomatous Colitis in Boxer Dogs. *Infection and Immunity* **74**, 4778–4792 (2006).
110. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
111. Cabal, A. *et al.* Assessment of Virulence Factors Characteristic of Human *Escherichia coli* Pathotypes and Antimicrobial Resistance in O157:H7 and Non-O157:H7 Isolates from Livestock in Spain: Table 1. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 4170–4172 (2013).
112. Rahmouni, O. *et al.* High carriage of adherent invasive *E. coli* in wildlife and healthy individuals. *Gut Pathogens* **10**, (2018).
113. Martin, H. M. *et al.* Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* **127**, 80–93 (2004).

114. Bringer, M.-A., Barnich, N., Glasser, A.-L., 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. *Infection and Immunity* **73**, 712–721 (2005).
115. Bringer, M.-A., Billard, E., Glasser, A.-L., Colombel, J.-F. & Darfeuille-Michaud, A. Replication of Crohn's disease-associated AIEC within macrophages is dependent on TNF- α secretion. *Laboratory Investigation* **92**, 411–419 (2012).
116. Clermont, O., Bonacorsi, S. & Bingen, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4555–4558 (2000).
117. Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E. & Gordon, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups: A new *E. coli* phylo-typing method. *Environmental Microbiology Reports* **5**, 58–65 (2013).
118. Wang, S.-Y., Lai, X.-H. & Uhlin, B. E. Expression of cytotoxicity by potential pathogens in the standard *Escherichia coli* collection of reference (ECOR) strains. *Microbiology* **145**, 3295–3303 (1999).
119. Jackson, S. A., Patel, I. R., Barnaba, T., LeClerc, J. E. & Cebula, T. A. Investigating the global genomic diversity of *Escherichia coli* using a multi-genome DNA microarray platform with novel gene prediction strategies. *BMC Genomics* **12**, 1–17 (2011).
120. Tenailon, O., Skurnik, D., Picard, B. & Denamur, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* **8**, 207–217 (2010).
121. Swidsinski, A. *et al.* Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**, 44–54 (2002).

122. Park, J. H., Peyrin-Biroulet, L., Eisenhut, M. & Shin, J. I. IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules. *Autoimmunity Reviews* **16**, 416–426 (2017).
123. Céspedes, S. *et al.* Genetic Diversity and Virulence Determinants of *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients with Crohn's Disease in Spain and Chile. *Frontiers in Microbiology* **8**, 1–14 (2017).
124. Conte, M. *et al.* Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features. *BMC Research Notes* **7**, 1–12 (2014).
125. Chow, J. & Mazmanian, S. K. A Pathobiont of the Microbiota Balances Host Colonization and Intestinal Inflammation. *Cell Host & Microbe* **7**, 265–276 (2010).
126. Chassaing, B., Koren, O., Carvalho, F. A., Ley, R. E. & Gewirtz, A. T. AIEC pathobiont instigates chronic colitis in susceptible hosts by altering microbiota composition. *Gut* **63**, 1069–1080 (2014).
127. Dozois, C. M. & Curtiss, R. Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of 'exotic' islands in the gene stream. *Vet. Res.* **30**, 157–179 (1999).
128. Harrison, E. *et al.* Rapid compensatory evolution promotes the survival of conjugative plasmids. *Mobile Genetic Elements* **6**, e1179074 (2016).
129. Coura, F. M. *et al.* Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil. *Folia Microbiologica* **62**, 139–144 (2017).
130. Martinez-Medina, M. *et al.* Similarity and Divergence among Adherent-Invasive *Escherichia coli* and Extraintestinal Pathogenic *E. coli* Strains. *Journal of Clinical Microbiology* **47**, 3968–3979 (2009).

131. Boyd, E. F. & Hartl, D. L. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. *J. Bacteriol.* **180**, 1159–1165 (1998).
132. Toma, C., Higa, N., Iyoda, S., Rivas, M. & Iwanaga, M. The long polar fimbriae genes identified in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are present in other diarrheagenic *E. coli* and in the standard *E. coli* collection of reference (ECOR) strains. *Research in Microbiology* **157**, 153–161 (2006).
133. Restieri, C., Garriss, G., Locas, M.-C. & Dozois, C. M. Autotransporter-Encoding Sequences Are Phylogenetically Distributed among *Escherichia coli* Clinical Isolates and Reference Strains. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 1553–1562 (2007).
134. Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V. A. & Davies, J. Antibiotic Resistance in the ECOR Collection: Integrons and Identification of a Novel *aad* Gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 1568–1574 (2000).
135. Dogan, B. *et al.* Inflammation-associated Adherent-invasive *Escherichia coli* Are Enriched in Pathways for Use of Propanediol and Iron and M-cell Translocation: *Inflammatory Bowel Diseases* **20**, 1919–1932 (2014).
136. Elhenawy, W., Oberc, A. & Coombes, B. K. A polymicrobial view of disease potential in Crohn's-associated adherent-invasive *E. coli*. *Gut Microbes* 1–9 (2017).
137. Nash, J. H. *et al.* Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics* **11**, 1–15 (2010).
138. Kern, R., Malki, A., Abdallah, J., Tagourt, J. & Richarme, G. *Escherichia coli* HdeB Is an Acid Stress Chaperone. *Journal of Bacteriology* **189**, 603–610 (2007).

139. Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. & Svabic-Vlahovic, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* **40**, 175–179 (2000).
140. Vejborg, R. M., Hancock, V., Petersen, A. M., Krogfelt, K. A. & Klemm, P. Comparative genomics of *Escherichia coli* isolated from patients with inflammatory bowel disease. *BMC Genomics* **12**, (2011).

RESUME

Portage fécal du pathovar *Escherichia coli* adhérent et invasif (AIEC) chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et des témoins sains.

L'étiologie exacte des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) reste actuellement méconnue. Mais un déséquilibre de la flore bactérienne, plus connu sous le nom de dysbiose et se traduisant par une augmentation de bactéries potentiellement pathogènes versus une diminution de bactéries bénéfiques, est démontré en permanence. De précédentes études ont permis de mettre en évidence la présence de souches pathogènes d'*E. coli* chez les patients atteints de la maladie de Crohn (MC). Ces souches appartiennent au pathovar Adherent Invasive *E. coli* (AIEC) et sont caractérisées par leur capacité à adhérer et à envahir les cellules épithéliales intestinales, à survivre et à se multiplier dans les macrophages en induisant une synthèse intense de TNF. La mise en évidence de ce pathovar a essentiellement été réalisée sur des biopsies de patients présentant une MC. Et bien que les mécanismes de pathogénicité et de virulence de la souche AIEC soient clairement déterminés, il n'existe pas d'études approfondies sur la prévalence des AIEC au niveau des matières fécales chez les patients atteints de MICI en comparaison à des individus sains. Ainsi, ce projet de thèse s'inscrit dans une meilleure compréhension de l'implication de ce pathovar AIEC dans les MICI au niveau luminal. Cette thèse cible différents points: prévalence et détection des AIEC, leur proportion relative par rapport à la flore *E. coli* totale, leur capacité d'invasion, leur phylogroupe ainsi que leur transmissibilité. A l'issue de ce travail, nous montrons que les AIEC sont retrouvés au niveau luminal chez les patients atteints de la MC mais également chez les patients présentant une rectocolite hémorragique, avec une détection des AIEC chez 33% et 2% respectivement. En outre, ces études ont permis de montrer une prévalence plus forte de ce pathovar dans les matières fécales d'individus sains (51%) en comparaison aux patients atteints de MICI. Et lorsque les AIEC sont présents, que ce soit chez les patients atteints de MICI et chez les témoins, ils représentent en moyenne 20 à 30% de la flore *E. coli*. Nous avons également pu montrer qu'il n'existe pas de différences significatives des scores d'invasion des isolats AIEC chez les patients atteints de MICI et chez les sujets sains. Certaines souches d'AIEC, isolées chez les patients atteints de MC et chez les sujets sains, ont été caractérisées génétiquement par la technique d'électrophorèse sur gel en champ pulsé. Sur ces souches, différents profils génétiques ont été obtenus attestant de la forte variabilité intra- et interindividuelle des AIEC. En conclusion, les AIEC, au vue de leur forte prévalence chez des sujets en bonne santé, seraient plutôt à reconsidérer comme des pathobionts ce qui définit un symbionte pouvant acquérir des propriétés virulentes chez un hôte prédisposé génétiquement en raison de facteurs environnementaux et/ou diététiques et ainsi favoriser l'inflammation intestinale.

Mots clés: MICI, dysbiose intestinale, AIEC, sujets sains.

ABSTRACT

Presence of the pathovar Adherent invasive *Escherichia coli* (AIEC) in feces of inflammatory bowel diseases patients and healthy controls.

Many studies have reported an imbalance of bacterial flora in patients with inflammatory bowel disease (IBD), which includes Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), defined as a dysbiosis, and resulting in an increase in potentially pathogenic bacteria versus a decrease in beneficial bacteria. Previous studies have highlighted the presence of pathogenic strains of *E. coli* in patients with CD. These strains belong to the pathovar Adherent Invasive *E. coli* (AIEC) and are characterized by their ability to adhere and invade intestinal epithelial cells, to survive and to multiply in macrophages by inducing an intense synthesis of TNF. In recent years, many studies established a link between AIEC pathovar and CD. Many of these studies have been performed on biopsies of patients with CD. And although the mechanisms of pathogenicity and virulence of the AIEC strain are clearly determined, there are no in-depth studies on the prevalence of AIEC in feces in IBD patients in comparison to healthy individuals. Thus, the goal of this thesis project is to better understand the involvement of AIEC pathovars in IBD at the luminal level. This thesis is based more precisely on the study of the prevalence of AIEC in feces of patients with IBD in comparison to healthy subjects, targeting different points: prevalence and detection of AIEC, their relative proportion compared to total *E. coli* flora, their invasion capacity, their phylogroup as well as their transmissibility. AIEC are found at luminal level in patients with CD but also in patients with UC, with detection of AIEC in 33% and 2% respectively. In addition, a higher prevalence of these pathovar is present in the feces of healthy individuals (51%) compared to patients with IBD. And when AIEC are present, both in IBD patients and in controls, they represent on average 20 to 30% of the *E. coli* flora. We have also been able to show that there are no significant differences in AIEC invasion scores in patients with IBD and in healthy subjects. Some AIEC strains, isolated in patients with CD and in healthy subjects, have been genetically characterized by pulsed-field gel electrophoresis. Different genetic profiles have been obtained attesting the high intra- and interindividual variability of AIEC strains. In conclusion, because of their high prevalence in healthy individuals, AIEC should be reconsidered as pathobionts, which defines a symbiont acquiring virulent properties in a genetically predisposed host due to environmental and / or dietary factors and thus promoting intestinal inflammation.

Key words: IBD, intestinal dysbiosis, AIEC, healthy controls.