

Survie et pathogénicité des EHEC dans l'environnement digestif: Interactions avec le microbiote et l'épithélium intestinal.: Influence de l'administration de levures probiotiques.

Charlotte Cordonnier

▶ To cite this version:

Charlotte Cordonnier. Survie et pathogénicité des EHEC dans l'environnement digestif : Interactions avec le microbiote et l'épithélium intestinal. : Influence de l'administration de levures probiotiques.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2015. Français. NNT : 2015CLF1MM21 . tel-02090553

HAL Id: tel-02090553 https://theses.hal.science/tel-02090553

Submitted on 4 Apr 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. UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL Année 2015 UNIVERSITÉ D'AUVERGNE N° d'ordre 21-DOC

ÉCOLE DOCTORALE

DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT N° d'ordre : 21-DOC

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne Pour l'obtention du grade de DOCTEUR (Décret du 5 juillet 1984)

Spécialités : Biotechnologie, Microbiologie et Santé

Soutenue le 18 décembre 2015

Charlotte CORDONNIER

Survie et pathogénicité des EHEC dans l'environnement digestif : interaction avec le microbiote et l'épithélium intestinal. Influence de l'administration de levures probiotiques.

Rapporteurs :	Mme Muriel THOMAS , Directeur de Recherche, MICALIS UMR1319 INRA/AgroParisTech, Jouy-en-Josas				
	Mr Hubert BRUGÈRE Professeur des Universités, INSERM UMR 1043, INRA USC1360, Université de Toulouse, INPT, ENVT, Toulouse				
Examinateur :	Mr Didier DUPONT Directeur de Recherche, STLO UMR1253 INRA/AgroCampusOuest, Rennes				
Directeurs de thèse :	Mme Valérie LIVRELLI Professeur des Universités, M2iSH, UMR INSERM/Université Clermont-Auvergne U1071, USC-INRA2018, Clermont-Ferrand				
	Mme Stéphanie BLANQUET-DIOT Maître de Conférences des Universités, EA 4678 CIDAM, Université Clermont-Auvergne, Clermont-Ferrand				
	Conception Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament, EA-CIDAM 4678, Université Clermont-Auvergne 28 place Henri Dunant – 63001 Clermont-Ferrand Cedex				
	Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte, M2iSH, UMR Inserm/Université Clermont-Auvergne U1071, USC-INRA 2018 28 place Henri Dunant – 63001 Clermont-Ferrand Cedex				

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL Année 2015 UNIVERSITÉ D'AUVERGNE N° d'ordre 21-DOC

ÉCOLE DOCTORALE

DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT N° d'ordre : 21-DOC

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne Pour l'obtention du grade de DOCTEUR (Décret du 5 juillet 1984)

Spécialités : Biotechnologie, Microbiologie et Santé

Soutenue le 18 décembre 2015

Charlotte CORDONNIER

Survie et pathogénicité des EHEC dans l'environnement digestif : interaction avec le microbiote et l'épithélium intestinal. Influence de l'administration de levures probiotiques.

Rapporteurs :	Mme Muriel THOMAS , Directeur de Recherche, MICALIS UMR1319 INRA/AgroParisTech, Jouy-en-Josas				
	Mr Hubert BRUGÈRE Professeur des Universités, INSERM UMR 1043, INRA USC1360, Université de Toulouse, INPT, ENVT, Toulouse				
Examinateur :	Mr Didier DUPONT Directeur de Recherche, STLO UMR1253 INRA/AgroCampusOuest, Rennes				
Directeurs de thèse :	Mme Valérie LIVRELLI Professeur des Universités, M2iSH, UMR INSERM/Université Clermont-Auvergne U1071, USC-INRA2018, Clermont-Ferrand				
	Mme Stéphanie BLANQUET-DIOT Maître de Conférences des Universités, EA 4678 CIDAM, Université Clermont-Auvergne, Clermont-Ferrand				
	Conception Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament, EA-CIDAM 4678, Université Clermont-Auvergne 28 place Henri Dunant – 63001 Clermont-Ferrand Cedex				
	Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte, M2iSH, UMR Inserm/Université Clermont-Auvergne U1071, USC-INRA 2018 28 place Henri Dunant – 63001 Clermont-Ferrand Cedex				

Résumé

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont des pathogènes majeurs pour l'homme responsables de toxiinfections alimentaires pouvant évoluer vers des complications potentiellement mortelles. La pathogénicité de ces souches est essentiellement due à la production de Shiga-toxines (Stx), même si d'autres facteurs semblent jouer un rôle important dans la virulence, comme des facteurs d'adhésion. La survie et la régulation des facteurs de virulence des EHEC dans l'environnement digestif humain sont des facteurs clés dans la pathogénicité bactérienne, mais restent à ce jour mal décrits, essentiellement en raison d'un manque de modèles d'étude adaptés. De plus, l'absence de traitement spécifique a conduit à s'intéresser à des moyens préventifs et/ou curatifs alternatifs, comme l'utilisation de probiotiques. L'objectif de ce travail de thèse est (i) **de mieux comprendre le comportement** de la souche de référence EHEC O157:H7 EDL933 dans l'environnement digestif humain simulé, et en particulier ses interactions avec le microbiote résident et l'épithélium intestinal, et (ii) **d'évaluer l'effet antagoniste d'une souche de levure probiotique** vis-à-vis de la survie, la virulence et l'interaction du pathogène avec l'épithélium intestinal, à l'aide d'approches *in vitro* et *in vivo* complémentaires.

En modèles digestifs *in vitro*, la souche EHEC survit dans l'estomac, voire se multiplie dans les parties distales de l'intestin grêle, alors qu'elle ne se maintient pas dans l'environnement colique. Les gènes de virulence codant les Stx et des adhésines majeurs (intimine et « Long Polar Fimbriae » ou Lpf) sont surexprimés dès les parties hautes du tractus digestifs, et ce, même en absence de cellules épithéliales. Les conditions rencontrées dans le tractus digestif supérieur de l'enfant, comparativement à celui de l'adulte, conduisent à une survie et un niveau d'expression des gènes codant les Stx et les Lpf plus élevés chez l'enfant, ce qui peut contribuer à expliquer la grande sensibilité de cette population aux infections à EHEC. Enfin, les Lpf semblent jouent un rôle clé dans le ciblage spécifique des cellules M et le tropisme des EHEC pour les plaques de Peyer, et ce, à la fois *in vitro* (cellules M en culture) et *in vivo* (anses iléales murines). Même si elle ne modifie pas la survie du pathogène dans l'environnement colique, la levure probiotique *S. cerevisiae* CNCM I-3856 a montré des propriétés antagonistes intéressantes vis-à-vis d'EHEC O157:H7 en (i) modulant favorablement l'activité fermentaire du microbiote intestinal, (ii) diminuant significativement l'expression des gènes codant les Stx et (iii) inhibant la translocation bactérienne au travers des plaques de Peyer et les lésions hémorragiques associées. Par ailleurs, l'effet du pathogène et des probiotiques sur le microbiote colique est individu dépendant, confortant l'hypothèse que des facteurs associés à l'hôte, comme le microbiote, pourraient conditionner l'évolution clinique des infections à EHEC et l'efficacité d'une stratégie probiotique.

Ce travail de thèse contribue à une meilleure compréhension du comportement des EHEC dans l'environnement digestif humain et confirme l'intérêt d'une stratégie probiotique dans la lutte contre le pathogène. Une étude plus approfondie du transcriptome du pathogène dans l'environnement digestif et une analyse par des méthodes haut débit du microbiote intestinal permettraient de continuer à mieux décrire la physiopathologie des infections à EHEC et comprendre les mécanismes associés à l'effet antagoniste des probiotiques.

Mots clefs : Escherichia coli enterohémorragique, Système de digestion *in vitro*, Microbiote, Probiotique, Anses iléales murines, Long Polar Fimbriae

ABSTRACT

The enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are major zoonotic pathogens responsible for food-borne infection which leads to life-threatening complications in humans. The main virulence determinant of EHEC is the production of Shiga toxins (Stx), even if other factors seem to play an important role in virulence, such as adhesion factors. Survival and virulence of EHEC strains in the human digestive environment are a key factor in bacterial pathogenesis but remains unclear owing to lack of relevant model. Moreover, no specific treatment has led to interest in preventative and / or curative alternatives, such as using probiotics. The objective of this study is to **better understand the behavior** of the reference strain EHEC O157:H7 EDL933 in the entire digestive tract, and in particular its interaction with the resident microbiota and the intestinal epithelium, and to **evaluate the antagonistic effect of the probiotic yeast**, *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856, using *in vitro* and *in vivo* complementary approaches.

In vitro, bacterial mortality was noticed in the stomach, whereas bacterial growth resumption was observed in the distal parts of the small intestine and the pathogen was not able to maintain in the human colonic conditions. Virulence genes encoding Stx and adhesins (intimin and "Long polar fimbriae") are upregulated in the upper parts of the digestive tract. A tentime higher amount of cells was found in the ileal effluents of infant compared to adult. *stx* genes were over-expressed (up to 25-fold) in infant conditions compared to the adult ones. This results show that differences in digestive physicochemical parameters of the upper gastrointestinal tract may partially explain why infants are more susceptible to EHEC infection than adults. And finally, Lpf seem to play a key role in the interactions of EHEC with murine Peyer's patches and are needed for an active translocation of the pathogen across M cells, and both *in vitro* (M cells culture) and *in vivo* (murine ileal loops).

S. cerevisiae had not effect on EHEC survival in the colonic environment but (i) favorably influenced gut microbiota activity through beneficial modulation of short chain fatty acid production, (ii) leading to significantly decrease *stx* expression and (iii) significantly reduced EHEC translocation through M cells and inhibited *in vivo* interactions of the pathogen with Peyer's patches and the associated hemorrhagic lesions. Probiotic had donor-dependent effect on the gut microbiota strengthen the hypothesis that host-associated factors such as microbiota could influence the clinical evolution of EHEC infection and the effectiveness of a probiotic strategy.

This work contributes to a better understanding of the behavior of EHEC in the human digestive environment and confirms the interest of probiotic strategy in controlling EHEC infections. Further transcriptome studies are warranted for the pathogen in the human digestive environment, with or without probiotics for the better understanding of the pathophysiology of EHEC and so on the mechanisms involved in the antagonistic effect of probiotics.

Keywords: Enterohemorrhagic Escherichia coli, Digestive in vitro model, Gut microbiota, Probiotic, Mice ileal loops, Long Polar Fimbriae

À mon Rapa,

À mon Répé,

À mon jury de thèse, je remercie très sincèrement Madame le Docteur **Muriel Thomas** et Monsieur le Professeur **Hubert Brugère** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, d'avoir consacré du temps à la lecture, l'analyse et la critique de ce manuscrit.

Je tiens également à remercier Monsieur le Docteur **Didier Dupont** d'avoir accepté d'examiner ce travail et pris de son temps pour être présent le jour de ma soutenance de thèse.

À mes deux directrices de thèse, Madame Valérie Livrelli et Madame Stéphanie Blanquet-Diot, travailler à vos côtés pendant ces trois années aura été pour moi une superbe expérience. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée et pour votre soutien, merci aussi pour avoir su me guider avec une attention et une gentillesse constantes au cours de cette thèse. Un immense merci pour votre contribution à la réussite de cette thèse, et pour votre investissement important dans ce travail.

Stéphanie, merci de m'avoir fait découvrir le monde de la digestion artificielle et des « boîtes à caca ». Merci aussi pour tout le temps que tu as pris pour moi, et de manière générale pour tous tes étudiants, dans la correction de nos différents rapports, articles, thèses... avec ta rigueur rédactionnelle légendaire et le fameux « tabouret » à tes côtés pour travailler : il faudrait investir dans un fauteuil rembourré. Mes excuses à Jean-Pierre et tes enfants de t'avoir accaparée dans ces moments et merci à eux pour leur accueil chaleureux chez vous. Merci pour ton soutien dans les moments de doutes, autour d'une bonne Desperados.

Valérie, je te remercie très sincèrement de m'avoir fait confiance et cru en moi pour réaliser et mener à bien ce projet, ainsi que la liberté que tu m'as accordée durant cette thèse. Malgré ton emploi du temps (très ? beaucoup ? très beaucoup ?) chargé, au fil du temps on a réussi à avoir notre rythme de réunions tardives au détriment des cours de gym, désolée. Merci pour toutes tes remarques et réflexions scientifiques. Je te remercie aussi énormément pour la confiance que tu m'as accordée pour le poste d'ATER et aussi d'avoir pris pour toi, les cours que je n'ai pas pu assurer pendant ma rédaction, je m'en excuse encore. J'ai pris énormément de plaisir à enseigner à tes côtés et découvrir le monde des parasites et des champignons.

Enfin, je vous remercie très sincèrement pour toute l'aide que vous m'avez apportée dans ma recherche de postdoc et commencer ma nouvelle aventure.

Je souhaite également remercier Madame le Professeur **Monique Alric** et Monsieur le Professeur **Nicolas Barnich** pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire, EA-CIDAM et M2iSH, et m'avoir permis de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions et de participer à de nombreux congrès très enrichissants. J'ai également une pensée pour Madame le Professeur **Arlette Darfeuille-Michaud**, partie trop tôt, pour son accueil des plus chaleureux au sein de ce Laboratoire M2iSH, sa dimension humaine et sa bienveillance.

Je tiens aussi à exprimer ma vive reconnaissance à Mickaël Desvaux et Guillaume Dalmasso d'avoir accepté de suivre mon travail pendant ces 3 années lors des comités de thèse.

Je remercie également les membres de l'Unité de recherche Microbiologie 454 située sur le site INRA de Theix pour leur accueil chaleureux à fermenter dans votre P2... Tout a commencé avec toi Grégory en Master II, merci beaucoup de m'avoir fait découvrir la recherche et aussi d'avoir suivi mes avancées scientifiques sans oublier le papier sur B.t., je t'en suis très reconnaissante, Merci. J'en profite aussi pour remercier Annie et Dradra toujours bienveillantes à mon égard. Je remercie aussi les membres du plateau technique de l'Unité de recherche CALITYSS localisé sur le site de VetAgro Sup à Lempdes, pour leur gentillesse et leur accueil très chaleureux.

Je remercie très chaleureusement les piliers de l'Université d'Auvergne, Monsieur Jarrige et Monsieur Sion avec qui j'ai découvert l'enseignement pendant mes trois ans de monitorat et mon ATER. J'ai beaucoup appris et beaucoup apprécié enseigner à vos côtés, merci de de votre soutien et votre confiance malgré mes origines « UBP-enne ». Je me souviendrai toujours de notre trio en salle TP, de nos discussions intellectuelles et de l'efficacité du binôme **Sion**-Cordonnier. **Monsieur Jarrige**, je vous souhaite une bonne retraite dans votre château entouré de vos lamas, attention à la tonte de pelouse et aux doudous de vos petits-enfants.

Au vu de votre (très) grand nombre ... je préfère ne pas faire d'impair en omettant accidentellement l'un d'entre vous, ainsi j'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres passés et présents du **5e**, du **3^e**, du **R3** et du **rez-de-chaussée** (avant votre délocalisation dans de nouveaux locaux tout beaux-tout neufs), pour le temps passé en votre compagnie et toute l'aide que vous avez pu m'apporter à un moment ou à un autre. J'adresse des remerciements particuliers à **Hang Thi Thu**, pour ton aide et ta disponibilité à tout moment, tes précieux « advices » quand rien ne marchait et pour me lancer dans le postdoc américain, Merci. Et un grand Merci à **Mathilde B.** pour ton aide et tes conseils avisés au cours de la relecture de mon manuscrit et la préparation de mon oral.

Je voudrai fortement remercier les personnes avec qui j'ai travaillé directement tout au long de ces années : à Jonathan, merci pour notre collaboration dans les manipes et ton aide statistique ; à Charlène, merci d'avoir été un appui plus que solide pour les manipes TIM ; je remercie également Sandrine, toujours au taquet pour ces manipes TIM à la chaîne, et Sylvain, pour ton aide à dompter la « boîte à caca » quand elle décidait de déborder un dimanche... ; à Mickaël, notre livreur de McDo ou de Saint-Nectaire quand les manipes s'éternisaient tard dans la nuit et que le moral faiblissait ; les ATER Sandra, Amandine et Marie-Edith avec qui j'ai pu travailler et échanger, à tous les stagiaires que j'ai pu encadrés Mathilde, Valentin, Justine, Lucie., et enfin, mes collègues doctorants dans notre bureau à forte densité de population, Jessica, Cécily, Amélie, les Doc', Florie, Anaïs, Elodie, les Anciens et les Nouveaux...

Un énorme Merci tout particulier à Lucie E.-M., Lulu l'American Girl qui a initié l'histoire EHEC. On s'est côtoyé très peu de temps : je suis arrivée, tu es partie ; et pourtant tu as toujours été là. Notre passion commune pour les Anges, la culture Marseillaise ou les cœurs brisés a très certainement joué. Merci d'avoir été là pour prendre des nouvelles, rassurer, consoler, réconforter, corriger et conseiller, Dirty Dancing restera ton meilleur conseil... Merci d'avoir toujours été disponible et à l'écoute, et de m'aider dans mon aventure américaine ! Je nous imagine, Starbucks à la main, dans les rues à héler un taxi jaune, « Yeah yeah, it's amazing ! »... Xoxo Gossip Chacha

À la team Koh-Lanta (Yeah yeah Ah, Yeah Yeah Ah, Yeah Yeah Ah...frissons...) :

Alexis, notre Copine, l'expert en robes fourreaux, fan inconditionnel d'Avril Lavigne et Coyote Girl (pour son scénario, bien sûr), le représentant masculin des thésards ! Merci de nous avoir supportées, de ta galanterie...^^ et de toutes les soirées autour de bonnes bières (et ta tête les lendemains...) Bon courage pour la fin de thèse, essaie de ne pas trop bugger sur l'écran pendant la rédaction...

Allison, on a commencé ensemble à l'INRA en Master et fini ici notre thèse à quelques jours d'intervalle. On l'a fait ! Malgré nos doutes et nos questions existentielles (^^). Un énorme Merci pour ton aide, surtout dans la dernière ligne droite, tu es une pro de la relieuse et a été un soutien sans faille pendant les répètes de mon oral. Je te souhaite aussi beaucoup de bonheur et de réussite dans tes futurs projets !

Glagla, Madame Doyen, notre passion commune pour les appendices longitudinaux nous a rapprochées : toi le Flagelle, moi le Lpf; l'un visible, l'autre pas. La thèse n'est pas un long fleuve tranquille (ça en jette d'écrire ça !), et au moment de cette prose, tu es dans la dernière ligne droite qui parait interminable, mais tu es une warrior Glagla, et telle Queen B tu vas runner le world ! Et merci aussi à ton **mari**, le mélange que tu affectionnes tant de Spencer Reid, Vin Diesel et Poil de Carotte (la seule ressemblance vraiment flagrante...), pour toutes les soirées avec vous. Je terminerai sur le fait que j'ai laissé une rotule à votre mariage, j'espère que vous vous en souviendrez à vie !

Anaëlle, O₂, Divinité, Pasta Girl,... et tant d'autres, Perfection étant celui qui te sied le mieux. Mon meilleur souvenir? Une Valse. Mon pire? Notre éloignement géographique. Quel honneur d'avoir fait ta connaissance, Merci pour tous les bons moments passés, les squatages chez toi, ton soutien pendant ma période X-girl, les masques pour une peau de pêche, les Kinder Bueno, et tant d'autres. Tu es la première à être une « Titulaire », quel talent ! Je vous souhaite à toi et **Nala** que du bonheur dans cette nouvelle vie lyonnaise !

Seb, mon petit coquinou, tu as été un énorme soutien durant toute cette thèse. Merci pour tous ces bons moments passés, ces fous rires, ta gentillesse, ta bonne humeur, les bons repas que tu me concoctais,... Tu as toujours été une épaule attentive et une aide précieuse. Je te remercie pour tout et je te souhaite que du bonheur et de t'épanouir dans ta vie personnelle et professionnelle à venir.

Estelle, tout a commencé par une histoire turque et je l'en remercie, j'ai appris à te connaître : ta passion pour la couleur jaune, l'ensemble mini-jupes/voitures de sport, les chemises aux imprimés improbables, les C3... Merci vraiment pour toute ton aide : tes cours de glyco, ton soutien permanent pendant la rédaction, après et maintenant, mais surtout pour toutes ces soirées et bons moments partagés et à venir ! Je suis ravie d'avoir fait ta connaissance et de te compter parmi mes amis, tu es perchée, toujours de bons conseils (si, si), à l'écoute et drôle, Merci ! Kisu, Kisu. À tous mes amis qui ont régulièrement demandé des nouvelles de mes bébés bactéries mais surtout eux : ma **Mimi**, **Lulu**, **Stouf**, **Doudou** et **Ohlalaaaa** (« Ce fut une belle thèse, Ohlalaaaaa ! »), pour tous les bons moments passés, Mojitos, Tek paf, Vins de bon cru (nos aprèms piliers de comptoir au Vinidôme)...

À ma Famille, ces lignes ne suffisent pas pour vous dire un grand Merci, Merci pour votre soutien sans failles pendant ces trois ans, Pépé, Mémé Garnat et Mémé Saint-Voir, Tonton Louis, Tonton Marcel et Tonton Bernard, Tata Irène et Tata Betty, Aurore et Isa (je pense souvent très fort à toi), ... Philippe, Maman, Clément et bien sûr Alonso, et ses ronrons réconfortant.

Maman, Clément, Merci d'avoir toujours cru en moi, même quand moi non, à me pousser et m'encourager malgré mon caractère pas commode. Sans vous, ce travail n'aurait jamais abouti. Je vous dois tellement, Merci de votre amour et de votre présence dans toutes les étapes de cette aventure et celles à venir. Une pensée pour **Papa**, parti sans pouvoir voir nos parcours et partager tous ces moments avec nous.

Merci à Tous

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	i
Remerciements	v
Table des Matières	xi
Index des Illustrations	xvii
Index des Tableaux	xix
Liste des Abréviations	xxi
Avant-Propos	xxiii

PREMIÈRE PARTIE : Synthèse Bibliographie

CHAPITRE 1 : L	A DIGESTION HUMAINE ET SA MODÉLISATION	1
1.1. Le tract	us gastro-intestinal humain	
1.1.1. Physi	ologie générale de la digestion humaine	
1.1.1.1.	Digestion buccale	3
1.1.1.2.	Digestion gastrique	4
1.1.1.2.1.	Anatomie de l'estomac	4
1.1.1.2.2.	Sécrétions gastriques et rôle dans la digestion	5
1.1.1.3.	Digestion intestinale	6
1.1.1.3.1.	Anatomie de l'intestin grêle	6
1.1.1.3.2.	Cellules de la muqueuse intestinale	
1.1.1.	3.2.1. Entérocytes et absorption de nutriments	10
1.1.1.	3.2.2. Cellules caliciformes et production de mucus	11
1.1.1.	3.2.3. Cellules de Paneth et sécrétions de peptides anti-microbiens	
1.1.1.	3.2.4. Cellules du système lymphoïde associé à l'intestin	
1.1.1.3.3.	Sécrétions des glandes annexes et rôles dans la digestion	
1.1.1.	3.3.1. Suc pancréatique	
1.1.1.	3.3.2. Sécrétions biliaires	16
1.1.1.4.	Digestion colique	17
1.1.1.4.1.	Anatomie et physiologie du côlon	17
1.1.1.4.2.	Rôle du côlon dans la digestion	19
1.1.2. Écos	estème microbien digestif	20
1.1.2.1.	Établissement du microbiote intestinal	20
1.1.2.2.	Caractérisation du microbiote intestinal	21
1.1.2.3.	Diversité et abondance microbienne dans le tractus digestif humain	21
1.1.2.3.1.	Diversité et distribution longitudinale du microbiote gastro-intestinal	23
1.1.2.3.2.	Distribution transversale du microbiote intestinal : de la muqueuse à la lumière intestinale	
1.1.2.3.3.	Diversités inter-individuelles	25
1.1.2.4.	Fonctions du microbiote intestinal	27
1.1.2.4.1.	Fonctions métaboliques	27
1.1.2.	4.1.1. Dégradation des sucres en AGCC	27
1.1.2.	4.1.2. Activité protéolytique	29
1.1.2.	4.1.3. Devenir des AGCC produits	

1.1.2.4.2.	Fonction trophique sur la muqueuse intestinale	
1.1.2.4.3.	Rôle dans la protection de l'hôte	
1.2. Système	s de digestion artificielle	
1.2.1. Mode	élisation de la digestion humaine	
1.2.1.1.	Estomacs artificiels	
1.2.1.2.	Modèles gastro-intestinaux multi-compartimentés	
1.2.1.2.1.	TNO Gastrointestinal Model 1 : TIM 1	
1.2.1.2.2.	Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem : SHIME [®]	41
1.2.1.3.	Modèles utilisés pour l'étude de l'écosystème colique	
1.2.1.3.1.	Modèle in vivo	43
1.2.1.3.2.	Modèle in vitro de l'environnement colique	44
1.2.1.	3.2.1. Systèmes de fermentation en « batch »	
1.2.1.	3.2.2. Systèmes de fermentation en semi-continu ou continu	
1.2.2. Avan	tages et limites des systèmes de digestion in vitro	

CHAPITRE 2 : I	Les <i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques	57
2.1. Escheri	chia coli : Taxonomie et définitions	58
2.1.1. Cara	icieres generaux	
2.1.2. Class	sification antigénique	58
2.1.3. Diffé	erents pathovars	59
2.2. Aspects	cliniques et épidémiologiques des infections à EHEC	63
2.2.1. Histo	prique	
2.2.2. Rése	rvoirs et vecteurs	
2.2.3. Aspe	cts cliniques	64
2.2.3.1.	SHU	
2.2.3.2.	PTT	
2.2.4. Aspe	cts épidémiologiques	66
2.2.4.1.	Épidémies dans le monde	
2.2.4.2.	Épidémies en France	
2.2.4.3.	Données épidémiologiques du SHU pédiatrique en France	69
2.2.4.4.	Prévalence et classifications des STEC	71
2.2.4.4.1	Sérotypes les plus fréquents	
2.2.4.4.2.	Classification des STEC en séropathotypes	
2.3. Facteur	s de virulence et pouvoir pathogène	73
2.3.1. Shig	a-toxines	
2.3.1.1.	Structure	73
2.3.1.2.	Variants	75
2.3.1.3.	Passage des Shiga-toxines au niveau de l'épithélium intestinal	
2.3.1.4.	Mécanisme d'action des Shiga-toxines au niveau des cellules cibles	
2.3.2. Rési	stance à l'acidité	80

2.3.3. Fac	cteurs d'adhésion	
2.3.3.1.	Lésion d'attachement-effacement	
2.3.3.2.	Long Polar Fimbriae	
2.3.3.2.	1. Distribution des variants <i>lpf</i>	
2.3.3.2.	2. Régulation de l'expression des <i>lpf</i>	
2.3.3.2.	3. Rôles des Lpf	
2.3.3.3.	Autres facteurs d'adhésion	86
2.3.4. Au	tres facteurs de virulence	89
2.3.5. Rég	gulation par les facteurs environnementaux du tractus digestif humain	89
2.3.5.1.	Acidité	
2.3.5.2.	Sels biliaires	
2.3.5.3.	Ethanolamine	
2.3.5.4.	Microbiote intestinal et métabolites fermentaires	
2.3.5.5.	Niches nutritionnelles	
2.3.5.6.	Adrénaline et noradrénaline	94
2.3.5.7.	Oxygène	
2.3.5.8.	Monoxyde d'azote	95
2.3.5.9.	Mouvements péristaltiques	
2.4. Diagn	ostic et stratégies thérapeutiques des infections à EHEC	
2.4.1. Dic	agnostic	
2.4.1.1.	Recherche microbiologique	
2.4.1.2.	Recherche de gènes de virulence	
2.4.1.3.	Recherche de Shiga-toxines dans les selles	
2.4.1.4.	Sérodiagnostic	
2.4.2. Str	atégies thérapeutiques	
2.4.2.1.	Traitement utilisés	
2.4.2.2.	Traitements en cours de développement	101

CHAPITR	E 3 : LA	STRATÉGIE	PROBIOTIQUE	DANS LES	INFECTIONS	À	Escherichia coli
ENTÉROF	IÉMORRAGI	QUE				•••••	
3.1. Lo	es probiotiqu	1es					103
3.1.1.	Concept de	probiotique					103
3.1.2.	Caractéristi	ques d'un prob	iotique				
3.1.3.	Microorgan	ismes à activité	é probiotique				106
3.1.4.	Mécanismes	d'action des p	robiotiques				107
3.1.4	1. Antag	gonisme direct					
3.1.4	2. Immu	nomodulation					109
3.1.4	.3. Exclu	ision					110
3.1.5.	Potentiel pr	obiotique des l	evures				111
3.1.5	1. Les le	evures probioti	ques du genre Sac	charomyces			111

3.	.1.5.2.	Saccharomyces cerevisiae var cerevisiae CNCM I-3856	113
3.1.0	6. Risq	ues associés aux stratégies probiotiques	114
3.2.	Stratég	ie probiotique dans la prévention et/ou le traitement des infections à EHEC	116

Revue de Littérature : « Prob	iotic and	enterohemorrhagic	Escherichia	coli: An effective
strategy against a deadly enemy?	»			

DEUXIÈME PARTIE : Travaux expérimentaux

139

CHAPITRE 1 : COMPORTEMENT DE LA LEVURE PROBIOTIQUE S. cerevisiae CNCM-I3856 da	ANS LE
TRACTUS DIGESTIF HUMAIN SIMULÉ	143
Introduction à la publication n°1	143
Publication n°1 : « Dynamic in vitro models of the human gastrointestinal tract as relevant	tools to
assess the survival of probiotic strains and their interactions with gut microbiota »	145
Commentaires de la publication n°1	169
CHAPITRE 2 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT PROBIOTIQUE PRÉVENTIF SUR LA SURVIE	ET LA
PATHGÉNICITÉ DES EHEC DANS L'ENVIRONNEMENT COLIOUE HUMAIN SIMULÉ	173
Introduction à la publication n°2	173
Publication n°2 : « Enterohemorrhagic E. coli infection has donor-dependent effect on hum	an gut
microbiota and may be antagonized by probiotic yeast during interaction with Pever's patch	es »177
Commentaires de la publication n°2	193
CHAPITRE 3 : INTERACTION DES EHEC AVEC L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL	199
Introduction à la publication n°3	199
Publication n°3 : « Enterohemorrhagic Escherichia coli pathogenesis : role of Long polar f	ìmbriae
in Pever's patches interactions »	203
Commentaires de la publication n°3	229
1	
CHAPITRE 4 : SURVIE ET VIRULENCE DES EHEC DANS L'ENVIRONNEMENT DIGESTIF SIM	ULÉ DE
L'ENFANT	237
Introduction à la publication n°4	237
Publication n°4 : « Increased EHEC survival and virulence gene expression indicate an enh	anced
pathogenicity upon simulated pediatric gastrointestinal conditions »	239
Commentaires de la publication n°4	251

TROISIÈME PARTIE : Discussion et Conclusion générale

257

DISCUSSION GÉNÉRALE	. 259
Pathogénicité des EHEC dans l'environnement digestif humain somulé	. 263
Influence d'un traitement probiotique à base de levure S. cerevisiae CNCMI-3856	. 275
CONCLUSION GÉNÉRALE	. 285

<u>Références Bibliographiques</u>

ANNEXES	323
POPRIÉTÉS D'ADHÉSION DES EHEC AUX CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES Publication n°5 : « In vitro adhesion properties of Shiga toxin-producing Escherichia	
from cattle, food and humans »	
CURRICULUM VITAE	339

INDEX DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1. Organisation générale du système digestif humain et des glandes annexes (Modifié d'après Sherwood, 2006)	2
FIGURE 2. Organisation générale de l'estomac (D'après Sherwood 2006)	4
FIGURE 3. Structure cellulaire de l'estomac (Modifié d'après Sherwood 2006)	5
FIGURE 4. Organisation générale de l'intestin grêle	7
FIGURE 5. Représentation schématique de la paroi et de l'épithélium intestinal (Modifié d'après Tortora et Grabowski 1994)	
FIGURE 6. Représentation schématique de la structure de l'épithélium intestinal de l'intestin grêle (Modifié d'après Peterson et Artis 2014)	9
FIGURE 7. Localisation de l'absorption intestinale (Modifié d'après Gropper et Smith 2012)	10
FIGURE 8. Épaisseur de couches de mucus tapissant l'épithélium en fonction de la localisation inte (Modifié d'après Atuma et <i>al.</i> , 2001)	estinale 11
FIGURE 9. Microenvironnement d'une crypte intestinale (D'après Lotz et <i>al.</i> , 2007)	12
FIGURE 10. Représentation schématique d'une plaque de Peyer (Modifié d'après Junt et al., 2008)	14
FIGURE 11. Organisation générale des organes digestifs annexes	15
FIGURE 12. Organisation générale du côlon humain	17
FIGURE 13. Représentation schématique de la structure de l'épithélium intestinal du côlon (Modifié d'après Peterson et Artis 2014)	18
FIGURE 14. Analyse métagénomique de séquences d'ADN extraites de l'ADN fécal de nourrise fonction du temps (D'après Koepig et al. 2011)	sons en
FIGURE 15 Diversité et abondance bactérienne dans les différents segments du tube digestif humair	
FIGURE 16. Abondance bactérienne au niveau du genre et du phylum du microbiote humain (Modifié d'après Arumugam et <i>al.</i> 2011)	colique
FIGURE 17. Principales fonctions du microbiote intestinal humain (Modifié d'après O'Hara et Shanahan, 2006)	
FIGURE 18. Chaîne trophique de dégradation des fibres alimentaires	
FIGURE 19. Métabolisme des protéines par le microbiote (Modifié d'après Bernalier-Donadille, 2010)	29
FIGURE 20. Principaux modèles d'estomacs artificiels (D'après Blanquet-Diot et <i>al.</i> , 2013)	33
FIGURE 21. Modèle bi-compartimenté dynamique <i>in vitro</i> du tractus digestif supérieur humain	36
FIGURE 22. Représentation schématique du système digestif artificiel TIM 1 (D'après Guerra et <i>al.</i> , 2012)	38
FIGURE 23. Représentation schématique du système SHIME [®] (D'après Vermeiren et <i>al.</i> , 2011)	41
FIGURE 24. Représentation schématique du système ARCOL	46
FIGURE 25. Modélisation de l'environnement mucosal et des interactions hôte-microorganismes	54
FIGURE 26. Arbre phylogénétique des <i>E. coli</i> entéropathogènes (D'après Croxen et <i>al.,</i> 2013)	60
FIGURE 27. Flux de STEC et voies de contamination de l'Homme par les EHEC	
(D'après Brugère et al. 2012)	64

FIGURE 28. Évolution clinique des infections à <i>E. coli</i> entérohémorragiques (Adapté de Mariani-Kurkdjian et Bingen, 2012)
FIGURE 29. Distribution géographique de cas de SHU en France chez l'enfant de moins de 15 ans (D'après King et al., 2008 ; 2014 ; 2015)
FIGURE 30. Distribution mensuelle du nombre de SHU chez l'enfant de moins de 15 ans, France, 2009-2014 (D'après King et <i>al.</i> , 2015)
FIGURE 31. Représentation en ruban de la structure cristalline des Shiga-toxines (D'après Odumosu et al., 2010)
FIGURE 32. Régulation de l'expression des gènes <i>stx</i> (D'après Waldor et Friedman, 2005)
FIGURE 33. Nouveau modèle d'infection par les EHEC (Modifié d'après Etienne- Mesmin et al., 2011)
FIGURE 34. Mécanisme d'action des Shiga-toxines (Modifié d'après Le bilan des connaissances relatives aux STEC, AFSSA, 2003)
FIGURE 35. Systèmes de résistance à l'acidité chez <i>E. coli</i> (Modifié d'après Zhao et Houry, 2010)
FIGURE 36. Lésions d'attachement et d'effacement chez les EHEC
FIGURE 37. Organisation génétique des opérons <i>lpf</i> de la souche EHEC O157:H7 et O113:H21 (D'après Toma et <i>al.</i> , 2004)
FIGURE 38. Rôle proposé des adhésines des EHEC (D'après McWilliams et Torres, 2014)
FIGURE 39. Représentation simplifiée de la cartographie du génome <i>E. coli</i> O157:H7 EDL 933 et de ses plasmides
FIGURE 40. Régulation des gènes flagellaires et du LEE par les AGCC (D'après Tobe et <i>al.</i> , 2011)
FIGURE 41. Cascade de signalisation QseC et QseE adrénergique et noradrénergique chez les EHEC (D'après Hughes et <i>al.</i> , 2009)
FIGURE 42. Facteurs environnementaux digestifs régulant l'expression les gènes du LEE des EHEC (D'après Connolly et al., 2015)
FIGURE 43. Diagnostic d'une infection à EHEC (D'après Mariani-Kurkdjian et Bonacorsi, 2014)
FIGURE 44. Mécanismes d'action connus des probiotiques et leur fréquence (Modifié d'après Hill et al., 2014)
FIGURE 45. Schéma illustrant les principaux mécanismes d'action des probiotiques (D'après O'Toole et Cooney, 2008)
FIGURE 46. Modèle <i>in vitro</i> de culture de cellules M (D'après Gullberg et <i>al.</i> , 2000)
FIGURE 47. Modèle <i>in vivo</i> d'anses iléales (D'après Beuzón et Holden, 2001)
FIGURE 48. Test in vitro de compétitivité dans l'interaction avec la muqueuse intestinale
FIGURE 49. Comportement des EHEC au cours de leur transit dans l'environnement digestif humain 286
FIGURE 50. Influence de la levure probiotique S. cerevisiae CNCM I-3856 dans les infections à EHEC 286

INDEX DES TABLEAUX

TABLEAU 1. Études microbiologiques, nutritionnelles, pharmacologiques et toxicologiques utilisant le modèle in vitro TIM 1
TABLEAU 2. Études microbiologiques, nutritionnelles, pharmacologiques, toxicologiques, en santé et recherche et développement du SHIME [®]
TABLEAU 3. Principaux modèles in vitro coliques en mode semi-continu et leurs caractéristiques
TABLEAU 4. Principaux modèles in vitro coliques en mode continu et leurs caractéristiques 48
TABLEAU 5. Applications des principaux modèles in vitro coliques semi-continus
TABLEAU 6. Applications des principaux modèles in vitro coliques continus 52
TABLEAU 7. Les huit classes d'E. coli responsables de diarrhées chez l'Homme 59
TABLEAU 8. Liste non exhaustive des principales épidémies à Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines survenus dans le monde depuis 2005 (Modifié d'après Brugère et al., 2012) 68
TABLEAU 9. Incidence annuelle de SHU par 100000 enfants de moins de 15 ans, France, 1996-2014 (D'après King et al., 2015)
TABLEAU 10. Classification des sérotypes de STEC en séropathotypes (D'après Brugère et al., 2012)
TABLEAU 11. Principaux critères de sélection des souches probiotiques (Modifié d'après Klaenhammer et Kullen, 1999) 104
TABLEAU 12. Principaux microorganismes utilisés en tant que probiotiques chez l'Homme (D'après de Penner et al., 2005)
TABLEAU 13. Liste des médicaments commercialisés en France contenant des levures <i>S. cerevisiae</i> ou <i>S. boulardii</i>
(D'après http://www.vid <i>al</i> .fr/, consulté en août 2015)
TABLEAU 14. Liste des maladies aigües et chroniques pour lesquelles la levure S. boulardii a montré une efficacité clinique (Modifié d'arrès Kelesidis et Pothoulakis 2012)
(Modifié d'après Kelesidis et Pothoulakis, 2012)

LISTE DES ABRÉVIATIONS

B. E. L. S.	Bifidobacterium Escherichia Lactobacillus Saccharomyces
A/E AAF/1 ADN ADNr 16S AGCC AI AIDA-1 AIEC AR	Attachement et Effacement Aggregative Adherence Fimbriae 1 Acide désoxyribonucléique Gènes codant l'ARN ribosomique 16S Acides Gras à Chaîne Courte AutoInducteur Adhesin Involved in Diffuse Adherence <i>E. coli</i> adhérents et invasifs Résistance à l'acidité
ARCOL	Acide ribonucléique
BARDOT	BActerial Rapid Detection using Optical scattering Technology Bundle Forming Bili
Cah	Calcium-binding antigen 43
cAMP CEACAM6	Homologue Adenosine MonoPhosphate cyclique CarcinoEmbryonic Antigen-related
CFA CIQUAL	Colonization Factor Antigen Centre d'Information sur la Qualité des Aliments
CLR	C-type Lectin Receptors
DAEC DGM	<i>E. coli</i> à adhésion diffuse Dynamic Gastric Model
EA CIDAM	Équipe d'Accueil « Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament »
EAggEC EAST	<i>E. coli</i> entéroagrégatifs Enteroaggregative <i>E. coli</i> heat stable Enterotoxin
ECL ECSIM	Cellules entérochromaffine-like Environmental Control System for Intestinal Microbiota
EF EFSA	Facteurs d'élongation European Food Standard Agency
EHEC	E. coli entérohémorragiques
ELEC	E. coli entéroinvasits
ELISA	Enzyme-Linkeu immunoSorbent Assay $F_{\rm coli}$ entéronathogènes
Erec	<i>E. coli</i> -secreted protein
ETEC	E coli entérotoxinogènes
ExPEC	<i>E. coli</i> pathogènes extra-intestinaux

FAO	Food and Agriculture Organization of The United Nations	
FDA	Federal Drug Administration	
GAD	AR dépendant de la décarboxylation du	
Gb3	Glutamate Récepteur cellulaire Globotriosy Céramide 3	
GIP GRAS	Glucose-dependent Inulinotropic peptide Generally Recognized As Safe	
HGS HMI	Human Gastric Simulator Host-Microbiota Interaction	
IκB Ig Iha IL InPEC	Inhibitor of Kb Immuno-globuline Vibrio cholerae IrgA homologue InterLeukine <i>E. coli</i> pathogènes intestinaux	
LEE ler Lpf Lrp	Locus d'Effacement des Entérocytes LEE-encoded-regulator Long polar fimbriae Leucine-responsive regulatory protein	
M-SHIMI M2iSH MAPK	E Mucosal SHIME Équipe « Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte » Mitogen-Activated Protein Kinases	
MNEC	E. coli associés à des méningites	
NF-κB NLR NOD	Nuclear Factor- κ B Nucleotide-binding oligomerization domaincontaining protein-Like Receptors Nucleotide-binding Oligomerization domaincontaining Protein	
OI	Qualars da	
OmpA OMS	Outer membrane protein A Organisation Mondiale de la Santé	
PAMP PCR pH PRR PTT	Pathogen-Associated Molecular Patterns Polymerase Chain Reaction potentiel Hydrogène Pattern Recognition Receptor Purpura Thrombotique Thrombocytopénique	
QPS	Qualified Presumption of Safety	
redox	potentiel d'oxydo-réduction	
Saa SHIME	STEC autoagglutinating adhesin Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem	

SHU	Syndrome Hémolytique et Urémique
STEAEC	E. coli entéroagrégatifs producteurs de
	Shigatoxines
STEC	E. coli producteurs de Shiga-toxines
Stx	Shiga-toxine
TIM 1	TNO Gastrointestinal Model 1
TIM 2	TNO Gastrointestinal Model 2
TIM-agc	TIM-advanced gastric compartment
Tir	Translocated intimin receptor
TLR	Toll-Like Receptors
TNF-α	Tumor Necrosis Factora
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unité Formant Colonies
UPEC	E. coli uropathogènes

AVANT-PROPOS

Découverts en 1982 aux États-Unis, les Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont devenus en une trentaine d'années un problème majeur de santé publique avec un impact important pour les industries agro-alimentaires. Les STEC isolés lors d'infections chez l'Homme sont appelés Escherichia coli entérohémorragiques (EHEC). Ils sont responsables de toxi-infections alimentaires pouvant évoluer vers des atteintes systémiques potentiellement mortelles comme le syndrome hémolytique et urémique (SHU) et le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT). La contamination par ces bactéries résulte principalement de l'ingestion de produits alimentaires contaminés, crus ou insuffisamment cuits. Le sérotype O157:H7 est le plus fréquemment impliqué dans les épidémies. La pathogénicité de ces bactéries est principalement due à la production de Shiga-toxines. La survie et la régulation des gènes de virulence des EHEC dans l'environnement digestif humain, ainsi que les interactions du pathogène avec le microbiote résident et l'épithélium intestinal, sont des facteurs importants dans la physiopathologie de ces infections mais restent insuffisamment décrits. De plus, l'absence de traitement spécifique et le fait que l'antibiothérapie augmente le risque de SHU ont conduit à s'intéresser à des moyens préventifs et/ou curatifs alternatifs, comme l'utilisation de probiotiques.

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont été effectués au sein de l'Équipe d'Accueil « Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament » (EA-CIDAM 4678), dirigée par le Professeur Monique Alric et l'Unité M2iSH « Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte » (UMR Inserm U1071, USC INRA 2018) dirigée par le Professeur Arlette Darfeuille-Michaud jusqu'en 2014, puis par le Docteur Nicolas Barnich. Ces deux laboratoires sont rattachés à l'Université d'Auvergne.

L'EA-CIDAM possède depuis près de vingt ans une expertise et un savoir-faire internationalement reconnus dans le domaine de la digestion artificielle. Elle a ainsi développé un plateau technologique autour de l'environnement digestif associant des outils *in vitro* de digestion, fermentation et absorption à des technologies de formulation et des outils moléculaires de génomique et post-génomique. En particulier, elle possède le système digestif

artificiel TIM 1 (TNO Gastrointestinal Model 1) simulant l'environnement luminal de l'estomac et l'intestin grêle ainsi que différents fermenteurs (e.g. ARCOL : « ARtificial COLon », ECSIM : « Environmental Control System for Intestinal Microbiota ») permettant de reproduire l'environnement colique. Les outils *in vitro* de l'EA-CIDAM reproduisent aussi bien l'environnement digestif de l'homme que celui de l'animal monogastrique (veau pré-ruminant, porcelet) et ce dans des conditions physiologiques ou pathologiques. L'objectif de l'équipe est de développer des produits ou des concepts innovants en Nutrition et Santé Humaine ou Animale. Actuellement, l'EA-CIDAM s'intéresse plus particulièrement à trois conditions physiopathologiques dans l'environnement digestif humain associées (i) au vieillissement, (ii) à la présence de polluants d'origine alimentaire et (iii) à la présence de bactéries pathogènes comme les EHEC. Dans chacune de ces situations, elle évalue l'intérêt de stratégies basées sur l'utilisation de souches probiotiques.

L'Unité M2iSH mène depuis une trentaine d'années des travaux consistant à analyser la relation hôte-pathogène, et s'intéresse notamment aux *Escherichia coli* (*E. coli*) pathogènes. Trois thèmes de recherche principaux sont aujourd'hui développés dans le laboratoire : (i) l'étude de l'implication d'*E. coli* dans les maladies inflammatoires chroniques du tube digestif, en particulier la maladie de Crohn, (ii) l'étude de la piste infectieuse à *E. coli* dans le développement du cancer colorectal et (iii) l'étude des facteurs impliqués dans la pathogénicité des *E. coli* entérohémorragiques. L'équipe « EHEC » dispose d'une large collection de souches productrices de Shiga-toxines isolées de bovins, d'aliments et de malades, et s'est spécialisée dans l'étude des facteurs de pathogénicité de ces bactéries. À l'heure actuelle, les travaux de l'équipe s'orientent vers l'étude du comportement des EHEC dans l'environnement digestif (survie, régulation des facteurs de virulence, interactions avec l'hôte) en utilisant (i) des outils moléculaires (ii) des modèles *in vitro* (lignées de cellules épithéliales, de macrophages, modèle original de cellules M) et (iii) des modèles animaux *ex vivo* (chambres de Ussing) et *in vivo* (modèles murins d'anses iléales).

Mes travaux de thèse, réalisés sous la direction du Professeur Valérie Livrelli (M2iSH) et du Docteur Stéphanie Blanquet-Diot (EA-CIDAM), s'inscrivent dans la continuité de travaux précédemment réalisés par ces deux équipes. Ainsi, les objectifs du travail de thèse qui m'a été confié étaient, dans un premier temps, de poursuivre l'étude du comportement de souches EHEC dans le tractus digestif humain supérieur, en examinant la survie et la virulence d'une souche EHEC O157:H7 en conditions digestives adulte et enfant simulées dans le modèle gastro-intestinal TIM 1. Puis, dans un second temps, nous avons étudié la survie et la virulence d'*E. coli* O157:H7 en conditions coliques humaines simulées (ARCOL) et déterminé l'influence du pathogène sur le microbiote colique humain implanté dans le fermenteur. Parallèlement, les propriétés antagonistes de la levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 vis-à-vis de la survie et de la virulence de la souche EHEC ont été évaluées dans l'environnement colique humain simulé lors d'un traitement « prophylactique ». Le dernier objectif était de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les interactions des EHEC avec l'épithélium intestinal, et plus particulièrement les plaques de Peyer, à l'aide de deux approches complémentaires, un modèle *in vitro* original de culture de cellules M et un modèle *in vivo* d'anses iléales murines. Enfin, l'éffet antagoniste des probiotiques vis-à-vis de la translocation des EHEC au travers de l'épithélium intestinal a également été testé en modèle murin.

La première partie de ce manuscrit présente le contexte scientifique général. Cette synthèse bibliographique s'articule autour de trois chapitres. Un premier chapitre introductif décrit la physiologie générale du tractus digestif humain, les conditions rencontrées dans la lumière gastro-intestinale chez l'homme ainsi que les principaux modèles in vitro permettant de modéliser l'environnement digestif humain. Un deuxième chapitre est consacré à la description de la physiopathologie des infections à EHEC, des facteurs de virulence bactériens et de la régulation de ces facteurs dans l'environnement digestif humain. Un dernier chapitre s'intéresse à l'utilisation des probiotiques dans le cadre des infections à EHEC, chapitre rédigé principalement sous la forme d'un revue de la littérature. Les résultats expérimentaux sont exposés sous la forme de quatre publications puis commentés dans la deuxième partie de ce manuscrit. Enfin, dans la partie discussion générale et conclusion, l'ensemble des résultats de cette thèse est discuté et des perspectives concernant l'ensemble de ce travail sont proposées.

PREMIÈRE PARTIE – Synthèse Bibliographique –

CHAPITRE 1 :

LA DIGESTION HUMAINE ET SA MODÉLISATION

SOMMAIRE

1.1. Le	e tractus gastro-intestinal humain	3
1.1.1.	Physiologie générale de la digestion humaine	3
1.1.2.	Écosystème microbien digestif	20
1.2. Le	es systèmes de digestion artificielle	
1.2.1.	Modélisation de la digestion humaine	
1.2.2.	Avantages et limites des systèmes de digestion in vitro	53
	6 7 6	

La digestion humaine désigne l'ensemble des phénomènes mécaniques et chimiques liés au fonctionnement de l'appareil digestif, et consiste en une succession d'étapes permettant la transformation des aliments en nutriments, où chaque partie du tractus digestif a un rôle spécifique. La fonction majeure de l'appareil digestif est le transfert vers l'organisme des nutriments, de l'eau et des électrolytes apportés par l'alimentation. Afin de mieux appréhender par la suite les avantages et les limites des différents systèmes digestifs artificiels, les paramètres essentiels de la digestif seront détaillés.

1



FIGURE 1. Organisation générale du système digestif humain et des glandes annexes (Modifié d'après Sherwood, 2006)

Le système digestif humain est composé de la bouche, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), du gros intestin (côlon ascendant, côlon transverse, côlon descendant et côlon sigmoïde), du rectum et de l'anus. Des organes et glandes annexes sont également associés à ce système : les trois principales glandes salivaires (parotides, sub-linguales et sub-mandibulaires), le pancréas, le foie, la vésicule biliaire et l'appendice.

1.1. Le tractus gastro-intestinal humain

1.1.1. Physiologie générale de la digestion humaine

L'appareil digestif est composé du tube digestif proprement dit et des organes digestifs annexes (Sherwood, 2006). Le tube digestif, d'une longueur moyenne de 7 m chez l'Homme, est constitué de la bouche, du pharynx, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), du gros intestin (successivement cæcum et appendice, côlon ascendant, côlon transverse, côlon descendant, côlon sigmoïde et rectum) et de l'anus. Les organes digestifs accessoires sont les glandes salivaires, le pancréas, le foie et la vésicule biliaire (**FIGURE 1**).

1.1.1.1. Digestion buccale

Le système digestif débute par la cavité orale qui est le siège des premières étapes de la digestion, avec la mastication (par l'action des dents, des joues et de la langue) et la sécrétion de salive par trois paires de glandes salivaires (glandes parotides, submandibulaires et sublinguales). La mastication est le premier acte mécanique de la digestion qui prépare les aliments en réduisant la taille des particules. Elle forme ainsi le bol alimentaire et favorise l'action des enzymes digestives dans l'intestin grêle. La salive est constituée d'environ 99 % d'eau contenant des électrolytes, des protéines comme des enzymes ou encore des immunoglobulines, de l'urée et de l'ammoniaque (de Almeida et *al.*, 2008). La digestion buccale est limitée à l'hydrolyse de polysaccharides en dextrine (et éventuellement en maltose) par l'amylase salivaire (ou ptyaline). L'action de cette enzyme se poursuit dans l'estomac tant que l'acidité gastrique n'a pas pénétré le bol alimentaire. Enfin, la déglutition est déclenchée quand le bol alimentaire est poussé volontairement par la langue de l'arrière de la cavité buccale dans le pharynx. La déglutition est un acte réflexe qui englobe l'ensemble des phénomènes moteurs qui font ainsi passer les aliments de la bouche à l'estomac (Sherwood 2006).
1.1.1.2. Digestion gastrique

1.1.1.2.1. Anatomie de l'estomac

L'estomac est un réservoir d'environ 15 cm de haut en forme de « J » situé entre l'œsophage et l'intestin grêle où règne, à l'état à jeun, un potentiel hydrogène (pH) médian de 1,55 (0,95 à 2,6). Le pH du contenu gastrique après un repas n'est pas constant dans le temps. En effet, le pH gastrique augmente dans les premières minutes post-ingestion pour atteindre une valeur comprise entre 5 et 6, puis atteint un pH inférieur à 2 dans les deux heures (Malagelada et *al.*, 1979 ; Van Wey et *al.*, 2014). D'un point de vue anatomique et fonctionnel, l'estomac peut être séparé en **estomac proximal** correspondant au fundus et au corps anatomique et en **estomac distal** correspondant à l'antre anatomique (**FIGURE 2**).



FIGURE 2. Organisation générale de l'estomac (D'après Sherwood 2006)

L'estomac proximal joue le rôle de réservoir des aliments déglutis et possède une activité sécrétoire importante alors que l'estomac distal assure la fragmentation et l'homogénéisation des solides et régule la vidange du produit de la digestion gastrique (chyme) dans le duodénum. Le pylore ferme l'estomac et agit comme un tamis en expulsant les liquides vers le duodénum mais en empêchant le passage des particules solides dont la taille est supérieure à 2 mm. Ceci entraîne un jet rétrograde favorisant le mélange du contenu (Khan et *al.*, 2009). Chez l'Homme, un temps de transit gastrique médian de 56 minutes (5 à 133 min)

Composé de trois parties qui sont le fundus, le corps et l'antre, l'estomac est un réservoir débutant au niveau du cardia et se terminant au pylore, permettant la jonction avec l'intestin grêle. Son épithélium de surface comporte des invaginations régulières (plis gastriques) où se trouvent les glandes gastriques constituées de différents types de cellules : les cellules à mucus, les cellules pariétales, les cellules principales et les cellules endocrines.

d'un repas standard (1500 kJ) a été déterminé par Worsöe et collaborateurs par suivi magnétique (Magnet Tracking System 1) (Worsöe et *al.* 2011).

La quantité de chyme à l'intérieur de l'estomac est le principal facteur influençant sa vitesse d'évacuation. Le contenu calorique du repas est aussi un élément essentiel qui régule directement la vidange gastrique, les lipides étant de puissants inhibiteurs de la vidange gastrique. Des facteurs extra-digestifs, telles que les émotions, peuvent aussi influencer la motilité gastrique. Ces effets sont différents et dépendants d'un individu à l'autre et restent donc imprévisibles (Sherwood 2006).

1.1.1.2.2. Sécrétions gastriques et rôle dans la digestion

La production de suc gastrique est d'environ deux litres par jour. Les cellules responsables de sa sécrétion font partie de la muqueuse gastrique. Les glandes gastriques comportent les cellules pariétales, les cellules principales, les cellules endo/paracrines et les cellules à mucus (**FIGURE 3**).



FIGURE 3. Structure cellulaire de l'estomac (Modifié d'après Sherwood 2006)

Quatre type de cellules composent l'estomac : (i) les cellules à mucus (superficielle et du collet) qui produisent en abondance la mucine qui, mélangée à l'eau, forme le mucus ; (ii) les cellules pariétales qui fabriquent l'acide chlorhydrique et le facteur intrinsèque ; (iii) les cellules principales qui sécrètent le pepsinogène et la lipase gastrique et (iv) les cellules G qui sécrètent la gastrine. Les cellules pariétales sécrètent de l'acide chlorhydrique (HCl) responsable de la chute du pH gastrique et de la dénaturation des protéines en cassant les ponts disulfures et les liaisons hydrogènes ainsi que le facteur intrinsèque nécessaire à l'absorption de la vitamine B₁₂ au niveau intestin*al.* Les cellules principales sécrètent le pepsinogène, précurseur d'une endopeptidase (la pepsine) activée par l'HCl, et la lipase gastrique impliquée dans la digestion des lipides. Les cellules endo/paracrines (cellules G, cellules entérochromaffine-like (ECL) et cellules D) sécrètent la gastrine, l'histamine, la somatostatine et la ghréline afin de réguler les sécrétions des cellules principales et pariétales. Enfin, les cellules à mucus sécrètent du mucus et du bicarbonate de sodium (NaHCO₃) qui protègent la muqueuse gastrique des agressions mécaniques, de l'auto-digestion et de l'acidité gastrique (Sherwood 2006).

1.1.1.3. Digestion intestinale

Le chyme entrant dans l'intestin grêle a subi une digestion relativement peu importante, la quasi-totalité de la digestion et de l'absorption ont lieu dans l'intestin grêle. Celui-ci assure ainsi l'essentiel du processus de digestion par ses propres sécrétions et par celles des deux glandes annexes (le pancréas, le foie et les vésicules biliaires) qui lui sont associées. Les processus d'absorption sont le résultat du flux de l'eau et des produits de digestion à travers l'épithélium intestin*al*.

1.1.1.3.1. Anatomie de l'intestin grêle

Sur le plan anatomique, l'intestin grêle s'étend du pylore à la valvule iléo-cæcale et mesure chez l'Homme en moyenne environ 6 mètres de long pour un diamètre moyen de 3 cm. Il est divisé en trois parties : (i) le duodénum, (ii) le jéjunum et (iii) l'iléon (**FIGURE 4A**). Après une période de jeûne d'au moins huit heures, les pH médians de ces trois sections anatomiques sont respectivement de 6,4 (5,9 à 6,8), 7,1 (6,6 à 7,9) et 7,4 (6,6 à 8,1) chez l'Homme (Fallingborg et *al.*, 1998). La grande capacité d'absorption de l'intestin grêle est liée à la structure de son épithélium (valvules, villosités, microvillosités) formant une bordure en brosse et permettant d'augmenter la surface d'absorption pour aboutir à une surface totale d'échanges d'environ 200 m² (**FIGURE 4B**).



(A) Organisation anatomique de l'intestin grêle



(B) Structure d'amplification de la surface d'échange

FIGURE 4. Organisation générale de l'intestin grêle

(A) L'intestin grêle est la partie de l'appareil digestif humain située entre l'estomac et le côlon. Il comprend un segment fixe, le duodénum, suivi de deux segments mobiles intra-péritonéaux, le jéjunum et l'iléon. (B) La topologie complexe de la paroi interne de l'intestin grêle lui confère une très grande surface d'absorption. La surface épithéliale de l'intestin grêle est principalement composée d'entérocytes assurant une fonction de barrière mécanique vis-à-vis du contenu luminal grâce aux jonctions serrées. La face apicale des entérocytes présente de très nombreuses évaginations, les microvillosités, formant du côté de la lumière intestinale la bordure en brosse.

La progression du chyme doit être suffisamment lente pour permettre une digestion et une absorption optimales (Khan et *al.*, 2009). En effet, les principaux mouvements de l'intestin grêle au cours de la digestion d'un repas sont des contractions de segmentation induisant des divisions du contenu intestinal et des mouvements de va-et-vient (Ganong 2005). Un temps de transit médian dans l'intestin grêle de 4 heures (3h30 à 6h30) a été déterminé par suivi magnétique (Worsöe et *al.*, 2011). Ce temps de transit peut varier entre 4 et 8 heures en fonction du contenu du chyme et des individus (Yuen 2010).

1.1.1.3.2. Cellules de la muqueuse intestinale

La paroi intestinale est composée de quatre couches principales nommées de la lumière intestinale vers les couches plus profondes : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse et la séreuse (Sherwood 2006) (**FIGURE 5**). La muqueuse est la couche la plus complexe. Elle est composée d'un épithélium et repose sur une lame basale (la *lamina propria*, riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques) et sur une fine couche musculaire de soutien appelée sous-muqueuse.



FIGURE 5. Représentation schématique de la paroi et de l'épithélium intestinal (modifié d'après Tortora et Grabowski 1994)

La paroi intestinale est composée de quatre couches, à savoir de la lumière intestinale vers les couches les plus profondes : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse et la séreuse

L'épithélium intestinal est une structure riche en replis et invaginations nommés respectivement villosités (ou villi) et cryptes de Lieberkühn (**FIGURE 6**). Les villosités intestinales sont caractéristiques de l'épithélium de l'intestin grêle et permettent d'augmenter la surface de la muqueuse pour favoriser l'absorption intestinale. Les cryptes de Lieberkühn découvertes par Jonathan Nathanael Lieberkühn au 19ème siècle, jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie cellulaire et sont le siège du renouvellement des cellules de l'épithélium de l'intestin grêle (Clevers 2013). En effet, le fond des cryptes intestinales est tapissé notamment de cellules souches qui permettent le renouvellement permanent de l'épithélium intestinal.



FIGURE 6. Représentation schématique de la structure de l'épithélium intestinal de l'intestin grêle (Modifié d'après Peterson et Artis 2014)

Les cellules souches prolifèrent au sein des cryptes intestinales et migrent le long des villosités et se différencient : (i) en cellules épithéliales intestinales (entérocytes) responsables de l'absorption des nutriments dans l'intestin grêle et de l'eau dans le côlon, (ii) en cellules entéroendocrines, qui sécrètent les des hormones, (iii) en cellules caliciformes (ou de globelet) qui sécrètent le mucus et (iv) en cellules de Paneth à la base des cryptes de l'intestin grêle responsables de la production des peptides antimicrobien. L'intestin grêle possède des régions spécialisées nommées follicules associés à l'épithélium composées des cellules M à la surface des plaques de Peyer et responsables de l'échantillonnage de la lumière intestinale.

L'épithélium intestinal est monostratifié et composé de quatre principales populations cellulaires différenciées qui dérivent de cellules souches pluripotentes et dont les proportions diffèrent selon les segments concernés : (i) les entérocytes, (ii) les cellules de Paneth, (iii) les cellules entéroendocrines, et (iv) les cellules calciformes. Chaque type cellulaire assure une fonction particulière, les entérocytes sont des cellules absorptives tandis que les trois autres types sont des cellules sécrétrices. De plus, au niveau de l'iléon les cellules M sont retrouvées et appartiennent au système immunitaire.

1.1.1.3.2.1. Entérocytes et absorption de nutriments

La digestion dans la lumière de l'intestin grêle est complète pour les lipides mais incomplète pour les glucides et les protéines. C'est dans la bordure des cellules épithéliales intestinales que la digestion est achevée. Les entérocytes, représentant 80% des cellules au niveau des villosités, ont essentiellement un rôle dans l'absorption mais assurent également un rôle digestif. Au pôle apical des entérocytes, différentes enzymes hydrolytiques (entérokinases, disaccharidases et aminopeptidases) sont présentes : ces enzymes ont été soit directement synthétisées par la cellule, soit proviennent du chyme et du suc pancréatique et ont été absorbées à la surface de l'entérocyte. Ces diverses enzymes assurent alors les dernières étapes de l'hydrolyse des protides et des glucides alimentaires qui peuvent alors être absorbés par les entérocytes qui les déverseront ensuite dans les capillaires sanguins. L'absorption au niveau duodénal intéresse surtout les glucides, l'eau et les électrolytes. Le jéjunum est le principal site d'absorption intestinale des macro- et micronutriments. L'iléon assure, quant à lui, un complément à l'absorption jéjunale et l'absorption de la vitamine B12 et des sels biliaires (FIGURE 7).



FIGURE 7. Localisation de l'absorption intestinale (Modifié d'après Gropper et Smith 2012)

La digestion et l'absorption des nutriments diffèrent selon leur nature. L'absorption est principalement le fait du duodénum et du jéjunum.

En fonction de leur nature, les produits de digestion peuvent être absorbés par trois mécanismes différents : (i) la diffusion simple à travers la membrane des entérocytes selon un gradient de concentration, (ii) la diffusion facilitée où les molécules sont transportées à travers la membrane des entérocytes grâce à des transporteurs, toujours selon un gradient de concentration et (iii) un transport actif grâce à des transporteurs membranaires utilisant l'énergie de la cellule ou un transport couplé à d'autres molécules.

1.1.1.3.2.2. Cellules caliciformes et production de mucus

Les cellules caliciformes sont localisées entre les entérocytes aussi bien au niveau des villosités que des cryptes et produisent de façon continue le mucus composé à 98% d'eau et à 2% de mucines (principalement MUC2). De nombreuses études réalisées chez l'Homme et chez l'animal ont montré que le tractus digestif est entièrement recouvert de mucus. L'intestin grêle est tapissé d'une fine couche de mucus alors que l'estomac et le côlon sont recouverts de deux couches de mucus. La couche interne (50-200µm) commune à l'estomac, à l'intestin grêle et au côlon est fortement liée à l'épithélium intestinal et assure sa protection (**FIGURE 8**).



FIGURE 8. Épaisseur de couches de mucus tapissant l'épithélium en fonction de la localisation intestinale (Modifié d'après Atuma et *al.*, 2001)

La couche interne de mucus est représentée en gris foncé et la couche externe est représentée en gris clair. Les épaisseurs de mucus correspondant aux différents segments du tube digestif sont exprimées en micromètres.

Cette couche concentre les peptides anti-microbiens sécrétés par les cellules de Paneth et les Immunoglobulines A, établissant ainsi une barrière physique étanche aux microorganismes et aux toxines qu'ils produisent et permettant leur maintien à distance de l'épithélium. Elle est continuellement renouvelée grâce à la sécrétion de mucines par les cellules caliciformes. Une modification protéolytique des mucines de la couche interne, dont le processus n'est pas encore clairement défini, remanie leur structure tridimensionnelle permettant ainsi la formation de la couche externe. Cette dernière, beaucoup plus épaisse, possède une bordure extérieure moins nettement définie et a pour fonction principale de lubrifier la lumière intestinale et d'héberger un nombre important de bactéries du microbiote (Johansson et Hansson 2011).

1.1.1.3.2.3. Cellules de Paneth et sécrétions de peptides antimicrobiens

Les cellules de Paneth sont situées exclusivement au fond des cryptes intestinales (FIGURE 9).



FIGURE 9. Microenvironnement d'une crypte intestinale (D'après Lotz et *al.*, 2007)

Les cryptes intestinales sont caractérisées par un environnement stérile. En effet, les cellules de Paneth vont sécréter des peptides antimicrobiens afin de protéger les cellules souches nécessaires au renouvellement de l'épithélium intestinal.

Les cellules de Paneth sont spécialisées dans la sécrétion de peptides antimicrobiens mais tous les types cellulaires de l'épithélium digestif, incluant les entérocytes et les cellules caliciformes participent à ce processus. Ces molécules antimicrobiennes participent à la protection contre les bactéries du microbiote et les agents pathogènes. Elles regroupent les défensines, la « secretory phospholipase A2 » (sPLA₂), RegIII γ , l'Angiogénine, les cathélicidines et les lectines de type C qui sont concentrées dans la couche interne de mucus, formant ainsi une barrière protectrice bactéricide par une action lytique directe sur la paroi bactérienne (Antoni et *al.*, 2014; Bulet et *al.*, 2004). Les lectines de type C sont des molécules de signalisation et d'adhérence du système immunitaire, qui se lient aux micro-organismes pour promouvoir l'activation des fonctions immunitaires telle que la phagocytose. Les défensines possèdent une activité antibiotique à large spectre contre les bactéries, les champignons et les virus (Selsted et Ouellette 2005).

1.1.1.3.2.4. Cellules du système lymphoïde associé à l'intestin

Le système immunitaire intestinal joue un rôle majeur dans la tolérance vis-à-vis du microbiote commensal intestinal (Abreu 2010). Les macrophages de la *lamina propria* assurent la phagocytose et l'élimination de bactéries commensales franchissant l'épithélium dans le cas d'une altération de son intégrité. Contrairement à certaines bactéries pathogènes qui ont acquis des moyens d'évasion ou de résistance aux cellules phagocytaires, les bactéries commensales y sont très sensibles.

Les cellules dendritiques, présentatrices d'antigènes, sont capables d'induire des réponses immunitaires adaptatives en présentant des antigènes aux lymphocytes T. Même si ces réponses peuvent être observées tout au long de l'épithélium intestinal, les plaques de Peyer sont les organes spécialisés dans ce mécanisme.

Les plaques de Peyer (**FIGURE 10**) sont localisées dans la muqueuse et une partie de la sous-muqueuse intestinales. Ce sont des organes lymphoïdes secondaires associés au tube digestif (« Gut Associated Lymphoid Tissue » ou GALT), sous-système du MALT (« Mucosa Associated Lymphoid Tissue » ou tissu lymphoïde associé aux muqueuses). Une plaque de Peyer est formée de deux composants principaux **un dôme** qui sépare la plaque de Peyer de l'épithélium superficiel sus-jacent et contient les lymphocytes B et **un centre germinatif** qui contient des lymphocytes B produisant des IgA, des lymphocytes T et des macrophages (Kierszenbaum 2006 ; Junt et *al.*, 2008; Kiyono et Fukuyama 2004).



FIGURE 10. Représentation schématique d'une plaque de Peyer (Modifié d'après Junt et *al.*, 2008)

L'échantillonnage antigénique réalisé par les cellules M (*microfold* ou *membranous*) permet, *via* les cellules présentatrices d'antigènes (par exemple les cellules dendritiques, les macrophages) la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative mettant en jeu les lymphocytes T et B.

Les plaques de Peyer sont bordées par un épithélium associé au follicule (FAE) constitué principalement de cellules M et de cellules dendritiques. Les cellules M, intercalées entre les entérocytes, représentent 5 à 10 % des cellules épithéliales du dôme. Leur domaine apical possède de courts micro-replis (d'où le nom de cellule M). Leur différenciation se fait à partir des entérocytes sous l'influence des lymphocytes, en particulier des lymphocytes B des follicules sous-jacents (Kernéis et *al.*, 1997). Ces cellules sont impliquées dans l'échantillonnage d'antigènes et de microorganismes (bactéries, virus) dans la lumière intestinale pour la présentation au système immunitaire sous-jacent (Neutra et *al.*, 1996). Les cellules dendritiques associées aux plaques de Peyer sont également capables de réaliser un échantillonnage antigénique suite à l'émission de protrusions passant à travers les cellules M (Lelouard et *al.*, 2012).

De par leur activité de transcytose, les cellules M représentent une porte d'entrée pour plusieurs pathogènes invasifs. En particulier, ce rôle a été décrit pour *Salmonella enterica*

serovar *Typhimurium* (Jones et *al.*, 1994 ; Martinez-Argudo et Jepson 2008) et les *E. coli* adhérents et Invasifs (AIEC) (Chassaing et *al.*, 2011 ; Roberts et *al.*, 2010) capables de cibler les cellules M *via* l'expression de *long polar fimbriae* (Bäumler, Tsolis, et Heffron 1996; Chassaing, Rolhion, Vallée, et al. 2011; Keita et Söderholm 2012). De plus, *Yersinia* utilise ses invasines (Inv) pour se lier aux intégrines β 1 exprimées au niveau du pôle apical des cellules M (Marra et Isberg 1997) et modifie l'intégrité de la barrière intestinale (Jung et *al.*, 2012; Meinzer et *al.*, 2012). *Shigella* utilise également les cellules M pour envahir l'organisme hôte mais les mécanismes impliqués restent inconnus à ce jour (Sansonetti, 2004 ; Corr et *al.*, 2008).

De plus, il a récemment été démontré que la glycoprotéine GP2, spécifiquement exprimée à la surface des cellules M, permet l'adhésion d'entérobactéries commensales et pathogènes telles que *Salmonella enterica* serovar Typhimurium et *E. coli* (Hase et *al.*, 2009). Cette étude a montré que c'est l'adhésine FimH, composant des pili de type 1, qui permet cette interaction avec les cellules M et la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique au sein des plaques de Peyer.

1.1.1.3.3. Sécrétions des glandes annexes et rôles dans la digestion

La digestion chimique dans l'intestin grêle est sous la dépendance du fonctionnement des organes digestifs annexes (pancréas, foie et vésicule biliaire) à l'origine des sécrétions pancréatiques et biliaires (FIGURE 11).



FIGURE 11. Organisation générale des organes digestifs annexes

Les organes annexes du tube digestif assurent la synthèse de diverses sécrétions indispensables à la digestion au niveau de l'intestin grêle. Le pancréas sécrète le suc pancréatique, déversé dans le duodénum via le canal de Wirsung. Le foie synthétise la bile, stockée dans la vésicule biliaire et déversée dans le duodénum via le canal cholédoque. L'ampoule de Vater est une cavité formée par la réunion du canal cholédoque et du canal de Wirsung. Elle est enveloppée d'un anneau musculaire, le sphincter d'Oddi, qui contrôle le passage des sécrétions biliaires et pancréatiques arrivant au duodénum.

1.1.1.3.3.1. Suc pancréatique

Le volume quotidien de suc pancréatique sécrété par le pancréas et entrant dans l'intestin grêle est d'environ 1500 mL par jour (Sherwood 2006). Ce dernier est constitué : d'enzymes pancréatiques digestives sécrétées par les cellules acineuses et d'une solution aqueuse alcaline riche en NaHCO₃ sécrétée par les cellules de la paroi des canaux pancréatiques permettant de neutraliser le chyme acide entrant dans l'intestin grêle (Silverthorn et *al.*, 2007).

Les principales enzymes pancréatiques (le trypsinogène, le chymotrypsinogène et la procarboxypeptidase) sont des protéases sécrétées sous forme inactive par les cellules acineuses. L'activation de ces enzymes a lieu dans l'intestin et débute par la conversion du trypsinogène en trypsine active dans la lumière duodénale par l'action d'une enzyme sécrétée par les cellules épithéliales de la muqueuse duodénale : l'entéropeptidase (ou entérokinase). Le chymotrypsinogène et la procarboxypeptidase sont convertis par la trypsine dans la lumière duodénale en chymotrypsine et carboxypeptidase actives. Chacune des protéases pancréatiques rompt différentes liaisons peptidiques : (i) la trypsine et la chymotrypsine sont des endopeptidases et (ii) les carboxypeptidases sont des exopeptidases (Khan et *al.*, 2009).

La lipase pancréatique est la seule enzyme intestinale capable de digérer les lipides. Elle est sécrétée sous forme active et hydrolyse les triglycérides des aliments en leur forme absorbable, les monoglycérides et les acides gras libres.

L'amylase pancréatique est sécrétée sous forme active et complète l'activité de l'amylase salivaire. Cependant, elle a une activité plus forte et transforme l'amidon en dextrine puis en maltose en coupant les liaisons $\alpha(1-4)$ glucosidiques.

1.1.1.3.3.2. Sécrétions biliaires

La bile, sécrétée par le foie et stockée dans la vésicule biliaire, est déversée dans la lumière duodénale à raison d'environ 500 mL par jour (Sherwood 2006). Les sécrétions biliaires sont composées d'eau, de sels minéraux, de cholestérol, de lécithine, de pigments biliaires (bilirubine et biliverdine) et de sels biliaires (molécules amphiphiles dérivées du cholestérol). Au cours de la digestion, les sels biliaires jouent un rôle important dans la digestion des lipides par la formation de micelles favorisant l'activité de la lipase pancréatique. Les acides biliaires suivent un cycle entéro-hépatique. En effet, après avoir contribué à la digestion et à l'absorption des lipides, 95% sont réabsorbés vers le sang grâce à un système de transport actif situé dans la partie terminale de l'iléon et retournent au foie par la veine porte où ils seront à nouveau sécrétés dans la bile. Les concentrations en sels biliaires dans le duodénum sont initialement de 10 à 15 mmol/L pour diminuer progressivement pendant les deux premières heures après le repas jusqu'à approximativement 5 mmol/L. Dans le jéjunum et l'iléon, des concentrations respectives de 10 mmol/L et de 2 à 4 mmol/L sont relevées après un repas (Northfield et McColl 1973).

1.1.1.4. Digestion colique

1.1.1.4.1. Anatomie et physiologie du côlon

Le côlon constitue la partie terminale du tube digestif. Il s'étend de la jonction iléocæcale à l'anus sur environ 100 cm et compte sept régions : (i) le cæcum doté d'un prolongement, l'appendice, (ii) le côlon ascendant, (iii) le côlon transverse, (iv) le côlon descendant, (v) le côlon sigmoïde, (vi) le rectum et (vii) l'anus (**FIGURE 12**) (Ganong 2005).



FIGURE 12. Organisation générale du côlon humain

Le côlon humain est divisé en trois parties anatomiques : le côlon ascendant, le côlon transverse et le côlon descendant. Le côlon sigmoïde et le rectum lui font suite. Les différentes parties du côlon sont le siège d'activités fermentaires différentes. D'un point de vue embryonnaire et morphologique, le côlon peut être décrit en deux parties (Larsen 2003) :

- le côlon proximal dérivé de l'intestin primitif moyen (cæcum, côlon ascendant et moitié droite du côlon transverse), vascularisé par l'artère mésentérique supérieure, dont le rôle est essentiellement l'absorption de l'eau et des électrolytes.
- le côlon distal dérivé de l'intestin primitif postérieur (moitié gauche du côlon transverse, côlon descendant, sigmoïde et rectum), vascularisé par l'artère mésentérique inférieure possédant une fonction de stockage et d'évacuation des déchets de l'alimentation.

L'épithélium colique est composé majoritairement de cellules caliciformes et d'entérocytes et se distingue de celui de l'intestin grêle par l'absence de plis et de villosités. Les cellules absorbantes (ou colonocytes) sont relativement peu nombreuses et présentent des microvillosités nettement plus courtes et moins nombreuses que dans l'intestin grêle (**FIGURE 13**). Les cellules à mucus sont plus nombreuses et sécrètent un gel muqueux favorisant le glissement des particules alimentaires non digérées et des fèces (van der Flier et Clevers 2009).



FIGURE 13. Représentation schématique de la structure de l'épithélium intestinal du côlon (Modifié d'après Peterson et Artis 2014)

L'épithélium colique est formé d'entérocytes et de cellules caliciformes. Ces dernières, abondantes, augmentent en nombre vers le rectum. Le mucus devient plus abondant protégeant la muqueuse des résidus digestifs de plus en plus déshydratés. Le mélange du chyme se poursuit dans le côlon grâce aux contractions de segmentation permettant d'engendrer un mouvement en masse des selles. Le temps de transit est fonction du segment colique considéré et de l'alimentation, de 3 à 5 heures dans le côlon ascendant, de 0,2 à 4 heures dans le côlon transverse et de 5 à 72 heures dans le côlon descendant et sigmoïde (Wilson 2010).

En raison de ses mouvements lents, un écosystème bactérien peut se mettre en place dans le côlon (l'établissement, la composition et les fonctions métaboliques de ce microbiote seront détaillés en 1.1.2). L'activité bactérienne du microbiote évolue le long du côlon et influence deux paramètres physicochimiques, le pH et le potentiel d'oxydo-réduction. Les pH médians et les potentiels d'oxydo-réduction (redox) moyens du contenu colique sont respectivement de 5,9 (5,3 à 6,7) et -415 mV \pm -72 dans le côlon proximal et de 6,1 (5,2 à 7,0) et -380 mV \pm -110 dans le côlon distal (Stirrup et *al.*, 1990 ; Press et *al.*, 1998).

1.1.1.4.2. Rôle du côlon dans la digestion

Les rôles physiologiques spécifiques du côlon sont la réabsorption hydro-électrolytique, la dégradation des composés non-digestibles et le stockage des selles avant défécation. Le côlon joue un rôle essentiel dans le contrôle du volume et de la composition ionique des selles. En situation physiologique, le côlon absorbe les ions sodium et chlorure et sécrète les ions potassium et bicarbonate (Khan et *al.*, 2009). De plus, le côlon humain héberge une communauté microbienne dense exerçant de nombreuses fonctions physiologiques détaillées dans le paragraphe suivant. Parmi ces fonctions, la fermentation des substrats exogènes (glucides non digérés ou non absorbés par l'intestin grêle) et endogènes (protéines issues de la desquamation cellulaire, enzymes digestives, mucus) qui conduit à la production d'une grande diversité de métabolites. Ces derniers sont principalement absorbés et utilisés par l'hôte. Ainsi, les interactions entre l'alimentation, le microbiote intestinal et l'hôte sont fondamentales pour le maintien de l'homéostasie de l'écosystème colique (Bernalier-Donadille 2010).

1.1.2. Écosystème microbien digestif

Le tube digestif héberge 10^{14} microorganismes vivant en symbiose avec l'hôte, ce qui représente un nombre environ 100 fois plus important que le nombre de cellules du corps humain. On parle d'«organe microbien» faisant partie intégrante de l'hôte (O'Hara et Shanahan 2006). Ce microbiote intestinal est essentiellement composé de centaines d'espèces bactériennes mais on retrouve également des cellules eucaryotes, des virus et des archées (Eckburg et *al.*, 2005 ; Walker et *al.*, 2014). Le terme de microbiote est fréquemment utilisé pour définir la seule composante bactérienne de la flore.

1.1.2.1. Établissement du microbiote intestinal

In utero, le tube digestif est stérile. Dès la naissance, des micro-organismes colonisent le tube digestif du nouveau-né sur toute sa longueur avec un gradient croissant dans le sens oroan*al*. Ces microorganismes sont issus principalement de la flore vaginale, intestinale et cutanée de la mère par un transfert vertical (Adlerberth et Wold 2009 ; Cho et Blaser 2012 ; Schmidt et *al.*, 2011). La colonisation du tube digestif suit une cinétique d'implantation montrant une augmentation progressive de la diversité au fil du temps et s'équilibre à l'âge de 2 ans (**FIGURE 14**).





La colonisation du tube digestif suit une cinétique d'implantation montrant une augmentation progressive de la diversité microbienne au fil du temps associée à une diminution progressive du nombre des Firmicutes et une augmentation du nombre des Actinobacteria et des Bacteroidetes.

ADN : acide désoxyribonucléique

Au cours de la vie, la composition du microbiote peut cependant être affectée par l'alimentation, l'activité du système immunitaire de l'hôte et par des changements physiologiques en particulier chez les personnes âgées (O'Toole et Claesson 2010).

1.1.2.2. Caractérisation du microbiote intestinal

La caractérisation du microbiote intestinal basée sur les techniques culturales ne permet de prendre en compte que 30% de la diversité des micro-organismes, la plupart des espèces bactériennes n'étant ni cultivable, ni identifiable avec les méthodes fondées sur les caractéristiques morphologiques et biochimiques. L'essor des techniques moléculaires, basées principalement sur le séquençage des gènes codant l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S), a permis une meilleure caractérisation des communautés microbiennes (Fraher et *al.*, 2012). Les microbiotes de l'œsophage humain, de l'estomac et de l'intestin grêle sont relativement peu étudiés. En effet, les études concernent principalement la caractérisation des communautés microbiennes de la cavité buccale et du côlon. De plus, la majorité des études publiées sur la diversité du microbiote intestinal est basée sur des résultats obtenus à partir d'échantillons de selles pour sa facilité d'échantillonnage, même si la flore fécale est significativement différente de la flore colique (Eckburg et *al.*, 2005).

1.1.2.3. Diversité et abondance microbienne dans le tractus digestif humain

La composition mais aussi les fonctions des communautés microbiennes varient le long du tractus gastro-intestinal (de la cavité buccale au rectum), mais aussi transversalement entre leurs parties luminale et mucosale (**FIGURE 15**). Des facteurs environnementaux fluctuants auxquels sont exposés les microorganismes, tels que le pH, la concentration en oxygène, en sels biliaires ou la composition du mucus, peuvent expliquer ces variations (Simrén et *al.*, 2013). Ainsi en fonction de l'organe digestif considéré, une flore différente est retrouvée, correspondant à des niches écologiques spécifiques (Collignon et Butel 2004).



(A) Évolution du pH et de la biomasse bactérienne le long du tractus digestif

(B) Diversité et abondance bactérienne dans les différents segments du tube digestif humain



(C) Évolution des niches luminale et mucosale dans l'iléon et le côlon

FIGURE 15. Diversité et abondance bactérienne dans les différents segments du tube digestif humain

Évolution longitudinale dans le tractus digestif du microbiote en fonction (A) de l'évolution du pH (Modifié d'après Walter et Ley 2011) et (B) des différents segments du système digestif humain (Modifié d'après Dave et *al.*, 2012). (C) Évolution radiale du microbiote intestinal en fonction des facteurs environnementaux (D'après Koropatkin et *al.*, 2012).

1.1.2.3.1. Diversité et distribution longitudinale du microbiote gastrointestinal

La **cavité buccale** et l'**œsophage distal**, dont la biomasse bactérienne est estimée à 10⁸⁻⁹ unités formant colonies par millilitre (UFC/mL), sont colonisés à 99% par des membres des phyla Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria et Fusobacteria (Ahn et *al.*, 2011 ; Pei et *al.*, 2004).

Le nombre et la diversité des microorganismes augmentent de l'estomac au côlon. La biomasse au niveau de l'**estomac** est généralement faible, estimée à environ 10²⁻³ UFC/mL en raison d'un pH acide (2-5) et d'un temps de transit court. Il était classiquement admis que l'estomac pouvait accueillir transitoirement quelques espèces bactériennes mais ne possédait pas de microbiote complexe. Or, cette idée a été bouleversée avec la découverte d'*Helicobacter pylori* (Marshall et Warren 1984) et plus récemment par l'identification d'une communauté de 128 phylotypes (Bik et *al.*, 2006). La majorité des séquences ont été assignées aux *phyla Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria* et *Fusobacteria* (Nardone et Compare 2015) (**FIGURE 15A et B**).

Le passage rapide des matières digestives dans l'intestin grêle ne permet pas une croissance bactérienne importante, mais le nombre de microorganismes augmente le long de l'intestin grêle de 10³⁻⁴ dans le duodénum à 10⁸ UFC/mL dans l'iléon parallèlement à une diminution de la concentration en sels biliaires et en oxygène. La flore du duodénum et du jéjunum est composée d'espèces aérobie-anaérobies facultatives (*Streptococcus, Lactobacillus, Enterobacteriaceae*) appartenant à la flore transitoire (Collignon et Butel 2004) (FIGURE 15A et B).

La vitesse de déplacement du contenu intestinal se ralentissant dans le **côlon**, la neutralité du pH et la faible concentration en sels biliaires, sont autant de paramètres facilitant le développement de communautés bactériennes complexes (G. T. Macfarlane et Macfarlane 2009). Ainsi, le microbiote intestinal est principalement abondant au niveau colique où la diversité et la densité de la population microbienne sont maximales : 10^{11} UFC/mL comprenant plus de 1000 espèces (**FIGURE 15A et B**). Chez l'adulte, la composition du microbiote colique varie entre individus mais la proportion des différents *phyla* reste relativement conservée. Trois *phyla* (sur 100 *phyla* connus) rassemblent la plupart des populations dominantes du côlon : les

Firmicutes, les *Bacteroidetes* et les *Actinobacteria* (Cho and Blaser, 2012 ; Eckburg et *al.*, 2005). Les *phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria* et *Verrucomicrobia* sont relativement peu représentés dans le microbiote colique (**FIGURE 16**). La faible abondance de séquences de *Proteobacteria* (y compris *Escherichia coli*) n'est pas surprenante, étant donné que les espèces anaérobies facultatives représentent environ 0,1% des bactéries dans l'environnement anaérobie stricte du côlon.



FIGURE 16. Abondance bactérienne au niveau du genre et du phylum du microbiote humain colique (Modifié d'après Arumugam et *al.* 2011)

L'abondance des 30 genres les plus abondants du microbiote est représentée. Chaque box-plot est coloré par phylum. Le microbiote de chaque individu est composé de plus de 1000 espèces bactériennes, et bien qu'il y ait des différences interindividuelles significatives, certaines espèces sont constamment présentes chez plus de 90% des individus.

1.1.2.3.2. Distribution transversale du microbiote intestinal : de la muqueuse à la lumière intestinale

L'épithélium intestinal est recouvert par une couche de mucus. Plusieurs facteurs intrinsèques tels que la présence de molécules de défense de l'hôte et un gradient d'oxygène, caractérisent le micro-environnement de la muqueuse qui est à différencier de la lumière

intestinale (FIGURE 15C). Certaines espèces microbiennes vivent à l'intérieur de la couche de mucus sécrétées par les cellules épithéliales.

Le microbiote luminal de l'iléon est constitué majoritairement d'espèces anaérobies strictes, appartenant au phylum *Bacteroidetes*, et d'espèces anaérobies facultatives (Hayashi et *al.*, 2005). Les populations bactériennes associées à la muqueuse de l'iléon terminal comprennent des membres du phylum *Bacteroidetes* et de *Clostridium* cluster XIVa (Wang et *al.*, 2003).

La couche externe de mucus du côlon est colonisée par 10^5 à 10^6 UFC/mL de mucus (Johansson et Hansson 2011). Un gradient transversal croissant de la densité et la diversité microbienne est observé de la muqueuse à la lumière du côlon. Les populations microbiennes associées à la muqueuse colique sont principalement caractérisées par des bactéries Firmicutes et plus particulièrement *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae*. Des études moléculaires montrent que pour un individu donné, les profils bactériens de biopsies obtenus à différents niveaux coliques sont similaires entre eux, mais sont en revanche différents de ceux d'origine fécale (Lepage et *al.* 2005 ; Zoetendal et *al.* 2002). Plusieurs études ont montré une constance dans les espèces microbiennes associées à la muqueuse colique, et ce, quelle que soit la localisation longitudinale (Eckburg et *al.*, 2005 ; Z. Zhang et *al.*, 2014). Ainsi, la paroi intestinale et la couche de mucus permettraient le maintien de conditions plus stables.

1.1.2.3.3. Diversités inter-individuelles

Différentes communautés microbiennes sont à discerner dans le tractus gastrointestinal : les membres **autochtones**, communs à la majorité des hôtes et les membres **allochtones** provenant de sources extérieures, présents uniquement chez certains hôtes, et pouvant être abondants (Walter et Ley 2011).

Le microbiote de chaque individu serait aussi caractérisé par une signature microbienne appelée «entérotype» (Arumugam et *al.*, 2011). Ainsi il existerait trois entérotypes différents dans le microbiote fécal humain correspondant à une dominance de *Bacteroides*, *Prevotella* ou *Ruminococcus* avec pour chacun des entérotypes une co-abondance de genres bactériens différents. L'existence de l'entérotype *Ruminococcus* est cependant controversée (Wu et *al.*,



FIGURE 17. Principales fonctions du microbiote intestinal humain (Modifié d'après O'Hara et Shanahan, 2006)

2011). De plus, les entérotypes *Bacteroides* et *Prevotella* seraient étroitement corrélés à la nature du régime alimentaire.

Malgré la grande variabilité d'espèces microbiennes selon les individus, la représentation phénotypique de l'ensemble des gènes incorporés dans le génome bactérien varie peu d'un individu à l'autre du fait d'une redondance fonctionnelle de ces différents gènes (Callister et *al.*, 2008). Un set de gènes commun à tous les individus a été identifié et appelé microbiome central (Turnbaugh and Gordon, 2009). Cet ensemble de gènes code des fonctions métaboliques, dont le rôle serait essentiel dans le maintien de la relation entre l'hôte et le microbiote. En parallèle de ce microbiome central, chaque individu possède également un microbiome fonctionnel variable, avec un set de gènes fonctionnels particulier et différent selon les individus (Yatsunenko et *al.*, 2012). Cependant le rôle exact du microbiome central et du microbiome variable dans la physiologie humaine reste encore mal connu.

1.1.2.4. Fonctions du microbiote intestinal

Le microbiote exerce de nombreuses fonctions essentielles pour le maintien de la santé de l'hôte au niveau intestinal mais aussi sur la physiologie générale de l'hôte. Le microbiote intestinal intervient dans l'homéostasie intestinale au niveau de nombreux processus physiologiques comme l'amélioration de l'efficacité de la captation énergétique des aliments ingérés, la synthèse de vitamines B et K, la prolifération cellulaire intestinale, le maintien du pH, le développement du système immunitaire et la protection contre les pathogènes, et exerce un effet trophique sur l'épithélium intestinal (**FIGURE 17**) (Montalto et *al.* 2009; O'Hara et Shanahan 2006).

1.1.2.4.1. Fonctions métaboliques

1.1.2.4.1.1. Dégradation des sucres en AGCC

Les bactéries des genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et *Roseburia* ainsi que certaines espèces de *Clostridium*, *Eubacterium* et *Enterococcus* sont dotées d'une activité hydrolytique permettant de dégrader les polysaccharides. Les principaux produits du métabolisme des glucides sont des acides gras à chaîne courte (AGCC) (FIGURE 18).



FIGURE 18. Chaîne trophique de dégradation des fibres alimentaires

La dégradation des fibres alimentaires fait intervenir un grand nombre de microorganismes organisés en chaîne trophique. Plusieurs espèces de bactéries (ou d'archées) sont capables d'assurer la fonction de dégradation des fibres (fibrolytiques), de fermentation des oses (bactéries glycolytiques), d'utilisation du succinate, lactate ou formate ou d'utilisation de l'hydrogène gazeux (H2) (hydrogénotrophes). Toutes ces communautés génèrent des produits finaux de fermentation : les acides gras à chaîne courte ou AGCC (acétate, propionate, butyrate), ainsi que des gaz (H₂, CO₂, CH₄).

Les AGCC majoritairement produits à partir des fermentations bactériennes sont l'acétate, le propionate et le butyrate. Le métabolisme des glucides conduit également à la production de métabolites intermédiaires, comme le succinate, le lactate, l'éthanol, le formate et des gaz tels que l'hydrogène et le dioxyde de carbone. La majorité des genres qui prédominent dans le côlon (*Bacteroides, Clostridium, Bifidobacterium, Ruminococcus, Eubacterium*) produisent de l'acétate dont une partie peut être utilisée au cours de la formation du butyrate.

Le propionate est principalement synthétisé par *Bacteroides*, *Propionibacterium* et *Veillonella*. (Bernalier-Donadille 2010).

1.1.2.4.1.2. Activité protéolytique

Les protéines et les peptides sont les principales sources d'azote dans le côlon (FIGURE 19). Un grand nombre de genres bactériens du côlon humain est doté d'une activité protéolytique (*Bacteroides, Clostridium, Propionibacterium, Fusobacterium, Streptococcus* et *Lactobacillus*).



FIGURE 19. Métabolisme des protéines par le microbiote (Modifié d'après Bernalier-Donadille, 2010)

La dégradation des protéines dans le côlon génère de nombreux métabolites potentiellement toxiques pour l'hôte (phénols, indole, amoniac). L'hydrolyse des protéines par des enzymes protéolytiques aboutit à la libération de peptides assimilés par différentes espèces bactériennes ou hydrolysés en acides aminés. La désamination des acides aminés est utilisée par les espèces bactériennes coliques conduisant essentiellement à la formation d'acides gras à chaîne courte et d'ammoniac, principal source d'énergie pour la synthèse protéique bactérienne. La désamination des acides aminés est réalisée par les espèces bactériennes coliques conduisant principalement à la formation d'AGCC majoritaires et d'ammoniac. Ce dernier est absorbé par la muqueuse colique et transporté par la veine porte jusqu'au foie, où il est converti en urée, qui est excrétée dans l'urine. L'ammoniac est également une source d'azote pour un grand nombre d'espèces bactériennes dans le côlon. Au sein des cellules bactériennes, des amino-transférases permettent aussi, grâce au transfert de l'ammoniac sur les squelettes carbonés, la synthèse d'acides aminés. Au cours du métabolisme des acides aminés, une large gamme de composés est formée, essentiellement des amines mais aussi des phénols, des acides dicarboxyliques et des acides gras ramifiés (isobutyrate, isovalérate) (Bernalier-Donadille 2010).

1.1.2.4.1.3. Devenir des AGCC produits

Jusqu'à 99% des AGCC sont absorbés au niveau de l'épithélium colique et servent de substrats énergétiques à la muqueuse colique (butyrate) et au foie (acétate, propionate) après passage par la veine porte. Ainsi, les concentrations en AGCC totales décroissent entre les différentes parties anatomiques du côlon. Cummings et collaborateurs ont montré des concentrations allant de 127 mmol/L dans le côlon ascendant (acétate 57%, propionate 22%, butyrate 21%) à 90 mmol/L dans le côlon descendant (acétate 57%, propionate 21%, butyrate 22%) (Cummings et *al.*, 1987). L'hydrogène (H₂) formé lors des processus fermentaires est majoritairement métabolisé par les espèces hydrogénotrophes, le reste étant éliminé par voie anale et par voie pulmonaire après passage dans le sang (Bernalier-Donadille 2010; Gérard et Bernalier-Donadille 2007).

1.1.2.4.2. Fonction trophique sur la muqueuse intestinale

Le microbiote a aussi une fonction trophique essentielle sur la muqueuse intestinale. Il contribue au développement de la muqueuse en facilitant la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales et l'angiogenèse (Li et *al.*, 2012 ; Stappenbeck et *al.*, 2002). Par exemple, en absence de microbiote, la vitesse de renouvellement des cellules est réduite de 20% chez le rat et l'épaisseur de la muqueuse est plus faible (Alam et *al.*, 1994).

1.1.2.4.3. Rôle dans la protection de l'hôte

Un des effets majeurs de la présence d'un microbiote dans le tube digestif humain est la protection de l'hôte contre les infections en empêchant la colonisation du tube digestif par les bactéries pathogènes (Moal et Servin, 2006). Cet effet barrière s'exerce à plusieurs niveaux, et tout d'abord par une compétition pour les nutriments. Le microbiote résident limite aussi la colonisation par les bactéries pathogènes en occupant la quasi-totalité des sites de colonisation situés sur l'épithélium intestin*al*. Un autre facteur important pour la mise en place de l'effet barrière est la production de molécules antimicrobiennes (Cerf-Bensussan et Gaboriau-Routhiau, 2010). Les bactéries du microbiote sont aussi capables d'induire la production de molécules antimicrobiennes gar les cellules épithéliales, en particulier par les cellules de Paneth situés au fond des cryptes des villosités de l'intestin grêle (Moal et Servin, 2006).

Le microbiote intervient aussi dans la maturation du système immunitaire digestif. En effet, le microbiote intestinal est nécessaire à la maturation du tissu lymphoïde intestinal et au bon développement du répertoire des lymphocytes B. Les lymphocytes se développent au contact d'antigènes intestinaux auxquels ils sont confrontés, notamment au niveau des plaques de Peyer (Mowat 2003). Le dialogue entre la muqueuse intestinale et le microbiote qui permet de maintenir un état homéostatique est assuré notamment par les récepteurs de l'immunité innée PRR (« Pattern Recognition Receptor »), les TLR (« Toll-like Receptor ») et les NLR (« NOD-Like Receptor »). Le pouvoir discriminant des TLRs et des NLRs face aux éléments du « soi » et du « non soi » microbien est basé sur la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes, les PAMPs (« Pathogens Associated Molecular Pattern ») (Leber et al., 2008). La fixation des PAMPs sur les TLRs et NLRs induit via une cascade de phosphorylations la transcription de gènes cibles comme ceux codant des cytokines pro inflammatoires (IL-6, IL-8 et TNF- α ...), des peptides antimicrobiens, ou encore le gène codant la protéine proinflammatoire COX-2. Les bactéries commensales peuvent donc moduler la réponse inflammatoire afin de maintenir l'intégrité de l'épithélium intestinal en conditions non physiopathologiques.

1.2. Systèmes de digestion artificielle

1.2.1. Modélisation de la digestion humaine

Pour des raisons réglementaires, budgétaires, techniques, scientifiques, de délai et/ou d'éthique, les méthodes de digestion in vitro s'avèrent être des compléments de plus en plus utiles à l'expérimentation animale et humaine, à condition que la pertinence de ces méthodes soit du niveau de celle des expériences in vivo. De très nombreux systèmes digestifs artificiels modélisant les conditions physicochimiques et/ou microbiologiques rencontrées dans l'environnement digestif humain ont été développés par différentes équipes. Ces systèmes peuvent être classés selon leur degré de complexité, mais aussi selon le fait qu'ils soient monoou multi-compartimentés, statiques ou dynamiques. Les potentialités de ces outils sont nombreuses et intéressent aussi bien le domaine de l'agroalimentaire, de la pharmacologie que des biotechnologies. Ainsi, ils peuvent être utilisés dans le cadre d'études nutritionnelles, toxicologiques, pharmaceutiques ou encore microbiologiques. Dans cette section, seront présentés les principaux modèles *in vitro* simulant la digestion humaine au niveau gastrique, intestinal et colique. La mastication est une étape essentielle dans la digestion et, à ce titre, différents masticateurs artificiels ont été développés (Woda et al., 2010). Néanmoins, ces systèmes ne seront pas détaillés dans ce manuscrit, ce travail de thèse n'ayant pas porté sur la mastication. Ainsi, seuls les systèmes in vitro permettant l'étude des réactions ayant lieu dans l'environnement digestif du tractus gastro-intestinal seront traités.

1.2.1.1. Estomacs artificiels

L'utilisation de modèles gastriques permet de déterminer les changements physiques et/ou chimiques subis par les aliments dans l'estomac et de suivre la libération de composés d'intérêt. Ils permettent notamment d'étudier l'influence sur ces processus de facteurs physiologiques (i.e. le pH, les enzymes et les forces de contraction), de la structure des aliments et des procédés de transformation (Fardet et *al.*, 2013). Les modèles gastriques permettent également d'étudier l'influence de l'acidité gastrique sur la survie de micro-organismes (Bergholz et Whittam 2007).



(A) Système statique mono-compartimenté (Chen et al., 2011)



(B) Système DGM (Mercuri et *al.*, 2011)

(C) Système HGS (Kong et Singh, 2010)

FIGURE 20. Principaux modèles d'estomacs artificiels (D'après Blanquet-Diot et *al.*, 2013)

DGM : Dynamic Gastric Model ; **HCl** : acide chlorydrique ; **HGS** : Human Gastric Simulator ; **J.G.** : Jus Gastrique

Les modèles gastriques les plus simples consistent en une hydrolyse peptidique d'aliments homogénéisés (37°C, pH 1-2 pendant 1 à 2 heures). D'autres modèles statiques intègrent des paramètres supplémentaires, comme celui développé par Chen et collaborateurs, qui reproduit à la fois le mélange des aliments avec le suc gastrique et les forces de compression auxquelles ils sont soumis (**FIGURE 20A**) (Chen et *al.*, 2011). Cependant, ces modèles ne simulent pas certaines fonctions très importantes de la digestion gastrique comme l'acidification progressive du contenu stomacal ou la vidange de l'estomac. Pour pallier ces limites, des modèles gastriques dynamiques intégrant ces paramètres ont été mis au point. Le plus simple est celui développé par Hoebler et collaborateurs, qui permet le contrôle de la température et du pH et reproduit l'ajout de pepsine et la vidange gastrique (Hoebler et *al.*, 2002). Un autre modèle plus complexe, le DGM (« Dynamic Gastric Model ») mimant les deux régions fonctionnelles de l'estomac a été décrit par Mercuri et collaborateurs : la partie supérieure modélise l'arrivée des sécrétions gastriques et leur mélange aux aliments et la partie

inférieure simule les forces de cisaillement et de broyage (**FIGURE 20B**) (Mercuri et *al.*, 2011). Malgré la sophistication de ce modèle, les forces mécaniques mises en jeu restent différentes de celles observées *in vivo*. Par des modèles mathématiques et leur implémentation informatique (modèles *in silico*), il a été montré que les ondes de contraction antrales avaient un rôle clé dans le mélange du chyme gastrique et un rôle indirect dans la vidange gastrique par des modifications locales de la pression dans le corps anatomique (Pal et *al.*, 2004). Ces forces mécaniques sont prises en compte dans le modèle de F. Kong et Singh (2010), le HGS (« Human Gastric Simulator ») qui reproduit le plus fidèlement possible les mouvements péristaltiques de l'estomac, en respectant leur amplitude, leur intensité et leur fréquence (**FIGURE 20C**).

Récemment, un nouveau modèle a été développé : le TIM-agc (TNO gastro-Intestinal Model advanced gastric compartment) simulant les profils de pression observés *in vivo* au cours du transit gastrique. Ce dernier est composé de trois parties qui peuvent être contractées de façon indépendante. La partie supérieure mime le corps de l'estomac avec une paroi souple qui se contracte progressivement afin de simuler la réduction du volume lors de la vidange gastrique. L'antre est divisé en deux parties successives, l'antre proximal et dist*al*. Les contractions de ces deux sections sont synchronisées pour simuler les vagues antrales. Enfin, une valve est synchronisée avec une onde antrale afin de simuler l'ouverture du sphincter pylorique lors de la vidange gastrique (Minekus 2015).

Bien que ces systèmes soient particulièrement pertinents pour étudier la digestion gastrique, ils ne fournissent qu'un aperçu partiel de la digestion dans le tractus gastro-intestin*al. In vivo*, l'estomac et l'intestin grêle forment des compartiments séparés dédiés à une fonction spécifique de la digestion. Afin d'étudier avec précision le devenir d'un composé digéré, il est donc particulièrement important de simuler chaque étape de la digestion et les temps de transit associés. En réponse, des systèmes gastro-intestinaux multicompartimentés ont été développés.

1.2.1.2. Modèles gastro-intestinaux multi-compartimentés

De nombreux systèmes gastro-intestinaux simulant l'estomac et/ou l'intestin grêle sont disponibles. Les plus simples sont des modèles **mono-compartimentés et statiques** reproduisant, dans un unique récipient, une phase gastrique (pepsine, pH 1-2) éventuellement précédée d'une étape de digestion buccale (salive, pH 6,5) et suivie d'une phase pancréatique

(enzymes pancréatiques, en présence ou non de bile, pH 6-7). Parmi ces systèmes, les plus connus sont ceux d'Englyst et *al.* (1996), de Garrett et *al.* (1999) et d'Oomen et *al.* (2003), qui ont été utilisés pour évaluer, respectivement, la digestibilité de l'amidon, la bioaccessibilité de caroténoïdes et celle de polluants. Ces systèmes conviennent particulièrement pour des approches préliminaires de pré-screening. Les paramètres digestifs utilisés tels que le pH, l'origine des enzymes digestives (porcine, humaine, fongique) ou encore les temps de digestion, peuvent fortement varier d'une étude à l'autre ce qui rend difficile la comparaison des résultats entre eux. Face à ce constat et au besoin d'harmoniser un protocole de digestion qui puisse être utilisé par l'ensemble de la communauté scientifique, le réseau de chercheurs européens COST «Infogest » a établi un consensus autour d'un protocole de digestion statique (Minekus et *al.* 2014).

Ces modèles mono-compartimentés statiques sont cependant loin de reproduire la complexité des processus de digestion *in vivo* puisqu'ils ne simulent pas la succession des compartiments digestifs observée chez l'Homme, les temps de transit associés et les fonctions propres à chacun de ces compartiments (i.e. le brassage, la dégradation des macromolécules et l'absorption des nutriments). Pour pallier ces limites, des systèmes bi et multi-compartimentés dynamiques ont été développés (Fardet et *al.*, 2013 ; Guerra et *al.*, 2012).

Parmi les **modèles bi-compartimentés**, on peut citer ceux décrits par Mainville et *al.*, (2005) et plus récemment par Ménard et *al.* (2014) et Levi et Lesmes (2014) simulant, en fonction de données *in vivo*, l'estomac et l'intestin grêle proximal humain.

Mainville et collaborateurs ont développé un modèle dynamique simulant l'estomac et le duodénum où le pH, la température, le temps de transit, la concentration en bile sont contrôlés et paramétrés par rapport à des données *in vivo*, dans le but d'étudier le potentiel probiotique de bactéries incorporées dans des aliments (**FIGURE 21A**) (Mainville et *al.*, 2005).



(A) Modèle bi-compartimenté dynamique de Mainville et *al.* (2005)



FIGURE 21. Modèle bi-compartimenté dynamique *in vitro* du tractus digestif supérieur humain

DIDGI : système dynamique de digestion gastro-intestinale

Levi et Lesmes ont élaboré un modèle *in vitro* avec deux bioréacteurs connectés en série pouvant recréer les conditions dynamiques rencontrées dans l'estomac et le duodénum de l'adulte ou des personnes âgées (**FIGURE 21B**) (Levi et Lesmes, 2014).

Le système dynamique de digestion gastro-intestinale (DIDGI[®]) développé par Ménard et collaborateurs a été paramétré pour simuler notamment la digestion du lait chez le nouveauné et plus particulièrement la déstructuration et les cinétiques d'hydrolyse de l'aliment (**FIGURE 21**C) (Ménard et *al.*, 2014). Cet outil reprend les parties hautes du système digestif, l'estomac et le duodénum. Le logiciel associé permet de piloter les vidanges gastriques et intestinales, la cinétique d'acidification gastrique, le flux de sécrétions et l'agitation dans les deux compartiments. Ce modèle, dépourvu de membranes de dialyse, ne mime cependant pas l'absorption.

Les **systèmes gastro-intestinaux alliant multi-compartimentation et dynamisme** sont rares. À ce jour, seuls le TIM 1 (TNO Gastrointestinal Model 1 ; Minekus et *al.*, 1995) et le SHIME[®] (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem ; Molly et *al.*, 1994 ; Molly et *al.*, 1993) répondent à ce critère et ont été validés par des corrélations *in vitro/in vivo*.

1.2.1.2.1. TNO Gastrointestinal Model 1 : TIM 1

Le système digestif artificiel TIM 1 (Minekus et *al.*, 1995), développé par le TNO Nutrition and Food Research Institute (Zeist, Pays-Bas), a été optimisé et validé en collaboration avec l'EA-CIDAM. Il comprend l'ensemble des compartiments du tractus digestif supérieur, à savoir l'estomac et les trois parties de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et reproduit de la façon la plus physiologique possible les conditions rencontrées dans la lumière gastrique et intestinale (**FIGURE 22**). Ainsi, il permet de simuler, en fonction de données *in vivo*, les paramètres essentiels de la digestion chez l'homme, i.e. la température, l'évolution du pH gastrique et intestinal, le brassage du chyme, l'arrivée séquentielle des enzymes digestives, les vidanges gastriques et iléales, le temps de transit gastro-intestinal et l'absorption passive de l'eau et des produits de digestion.



FIGURE 22. Représentation schématique du système digestif artificiel TIM 1 (D'après Guerra et *al.*, 2012)

Le système TIM 1 (TNO Gastrointestinal Model 1) est constitué de quatre compartiments simulant l'estomac et les trois parties de l'intestin grêle.

El : électrolytes, HCl : acide chlorhydrique, J.G. : jus gastrique ; J.P. : jus pancréatique ; NaHCO₃ : bicarbonate de sodium

Le TIM 1 est constitué de quatre compartiments en verre contenant des parois internes flexibles reproduisant l'estomac et les trois parties de l'intestin grêle. La température est maintenue à 37°C par passage d'eau thermostatée entre les parois en verre et les membranes internes flexibles. Le brassage du chyme est reproduit par compression des parois flexibles grâce à un système d'eau sous pression. Les différents compartiments sont reliés entre eux par des valves péristaltiques, lesquelles sont composées de trois tubes en « T » possédant chacun une membrane flexible interne. L'ouverture et la fermeture de ces valves sont pilotées informatiquement, permettant le passage d'une partie du chyme d'un compartiment à un autre, de façon à suivre une courbe de transit définie.

Les vidanges gastrique et iléale sont modélisées par l'équation suivante (Elashoff et al., 1982) :

$$f = 1 - 2^{-(\frac{t}{t_{1/2}})^{\beta}}$$

où *f* représente la fraction de repas délivrée, *t* le temps de vidange, $t_{1/2}$ le temps de demi-vidange et β un coefficient décrivant l'allure de la courbe.

Le volume des différents compartiments est contrôlé en continu par des capteurs de niveau. Les quatre compartiments sont équipés d'électrodes à pH permettant de vérifier le pH du chyme et, si besoin, d'activer différentes pompes afin de délivrer de l'HCl dans le compartiment stomacal et du NaHCO₃ dans les compartiments simulant l'intestin grêle.

Les solutions d'enzymes digestives et d'acides biliaires sécrétés *in vivo* sont intégrées dans le système TIM 1 au cours de la digestion. Ainsi, des solutions de (i) lipase et pepsine et (ii) pancréatine et bile sont respectivement apportées dans les compartiments stomacal et duodén*al*. De plus, des résidus gastrique, duodénal, jéjunal et iléal sont introduits dans le TIM 1 en début de digestion, afin de reproduire les conditions du jeûne. Le résidu duodénal contient de la trypsine qui activera les enzymes pancréatiques apportées au niveau duodén*al*. Parallèlement, un système de dialyse (seuil de coupure de 10 kDa) simule l'absorption passive de l'eau et des produits de digestion dans les compartiments jéjunal et ilé*al*.

L'ensemble des paramètres du système TIM 1 peuvent être contrôlés et ajustés. Il est alors possible de simuler aussi bien la digestion de l'Homme (nourrisson, adulte, personne âgée) que celle d'animaux monogastriques, et ce dans des conditions physiologiques ou pathologiques (hypo- ou hyper-acidité gastrique, insuffisance pancréatique). Le système TIM 1 a été utilisé dans le cadre de nombreuses études nutritionnelles, pharmacologiques et microbiologiques. Une liste des publications dans lesquelles le système TIM 1 a été utilisé depuis 2009 est présentée dans le **TABLEAU 1**.
TABLEAU 1. Études microbiologiques, nutritionnelles, pharmacologiques et toxicologiques utilisant le modèle *in vitro* TIM 1

		Objectifs de l'étude	Références	
Microbiologie				
Micro-organismes probiotiqu	ues			
Bactériens	*	Influence de la matrice alimentaire sur la survie de probiotique	Arroyo-López et <i>al.</i> , 2014 ; Jedidi et <i>al.</i> , 2014 ; Khalf et <i>al.</i> , 2010 ; Martinez et <i>al.</i> , 2011	
	*	Sélection de souches probiotiques d'origine fécale en fonction de leur survie	Mäkivuokko et al., 2012	
	*	Activité métabolique de souches probiotiques	Fernandez et <i>al.</i> , 2014 ; Kheadr et <i>al.</i> , 2010 ; Maathuis et <i>al.</i> , 2010	
	*	Survie et taux de germination de Bacillus subtilis	Hatanaka et al., 2012	
Levuriens	*	Influence de la formulation sur la survie de Saccharomyces cerevisiae	Blanquet-Diot et al., 2012 ; Cordonnier et al., 2015	
Micro-organismes pathogène	es			
Escherichia coli entérotoxinogène	\$	Influence de la digestion de tempe et de tofu sur leur propriété antiadhésive contre des pathogènes	Mo et <i>al.</i> , 2012	
Escherichia coli entérohémorragique	<u>ې</u>	Survie d' E. coli O157:H7 et influence d'un probiotique	Etienne-Mesmin et al., 2011b	
	*	Influence de la matrice alimentaire sur la survie de souche STEC/EHEC	Arroyo-López et al., 2014 ; Miszczycha et al., 2014	
NUTRITION				
Digestibilité de macronutrim	ents			
Glucides	<u>ې</u>	Influence du sécrétome de <i>Penicillium funiculosum</i> sur la digestibilité des glucides du blé	Lafond et <i>al.</i> , 2011	
	*	Microstructure et hydrolyse de l'amidon dans des boissons fermentées à base d'orge et d'avoine	Alminger et al., 2012	
	*	Hydrolyse de l'amidon dans des biscuits	Villemejane et al., 2015 ; 2016	
	*	Digestibilité de la fécule de maïs	Nalin et al., 2015	
	*	Etude de l'impact des mélanoïdines de pain	Helou et al., 2015	
Lipides	\$	Bioaccessibilité des acides gras issus de produits laitiers et de poissons	Domoto et <i>al.</i> , 2013 ; Maestre et <i>al.</i> , 2013 ; Gervais et <i>al.</i> , 2009	
	\$	Digestibilité des lipides issus d'émulsions stabilisées par des isolats protéiques de lactosérum	Helbig et al., 2013	
Protéines	*	Digestibilité des protéines du lait	Havenaar et al., 2013b; Nabil et al., 2011	
Bioaccessibilité de minéraux	, vita	mines ou phytoconstituants		
Minéraux	\$	Libération du sel contenu dans des fromages de type pâte pressée non cuite	Lvova et <i>al.</i> , 2012	
Vitamines	*	Influence du procédé de transformation sur la bioccessibilité de vitamines	Mo et al., 2013 ; Öhrvik et al., 2010 ; Déat et al., 2009	
Caroténoïdes et flavonoïdes	<u>ې</u>	Influence de la matrice alimentaire sur la bioaccessibilité du carotène et de lycopène	Nimalaratne et <i>al.</i> , 2015 ; Van Loo-Bouwman et <i>al.</i> , 2014 ; Richelle et <i>al.</i> , 2010 ; Blanquet-Diot et <i>al.</i> , 2009 ; Déat et <i>al.</i> , 2009	
	*	Influence de l'émulsification sur la biodisponibilité de la tangéritine	Ting et <i>al.</i> , 2015	
Composés phénoliques	<u>ې</u>	Influence de la matrice céréalière et du procédé de transformation sur la bioaccessibilité de composés phénoliques	Hemery et <i>al.</i> , 2010 ; Anson et <i>al.</i> , 2009a,b	
	\$	Capacité anti-oxydante et anti-inflammatoire de composés phénoliques bioaccessibles issus des différentes fractions du grain de blé	Anson et al., 2010	
	\$	Influence de la matrice alimentaire sur la biaccessibilité d'anthocyanes de myrtille	Ribnicky et <i>al.</i> , 2014 ; Lila et <i>al.</i> , 2011	
	*	Hydrolyse de composés phénoliques par des estérases et un probiotique	Bel-Rhlid et al., 2012, 2009,	
Pharmacologie				
	*	Évaluation de formulations pour l'encapsulation de composés nutraceutiques	Barker et al., 2014 ; Chen et al., 2010 ; Hébrard et al., 2009	
	*	Influence de la formulation sur la survie de Saccharomyces cerevisiae	Blanquet-Diot et al., 2012	
	\$	Absorption de substances actives	Verwei et <i>al.</i> , 2015 ; Havenaar et <i>al.</i> , 2013a ; Dickinson et <i>al.</i> , 2012	
	*	Interactions aliments/médicaments	Brouwers et al., 2011	
Toxicologie				
	*	Bioaccessibilité des métaux lourds	Torres-Escribano et al., 2011	
	*	Bioaccessibilité et transformation d'éther glycidyle d'origine alimentaire	Frank et al., 2013	
	\$	Formation de N-nitrosodiméthylamine issus de la consommation de poissons et de végétaux riches en nitrate	Zeilmaker et al., 2010	

1.2.1.2.2. Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem : SHIME[®]

Le système SHIME[®] développé à l'origine par Molly et collaborateurs de l'Université de Ghent (Gand, Belgique) est le seul modèle gastro-intestinal dynamique « complet » (Molly et *al.*, 1993). Il est composé de cinq bioréacteurs qui simulent de façon séquentielle l'estomac, l'intestin grêle et les trois régions du côlon (i.e. côlon ascendant, transverse et descendant). Un filtre de dialyse peut être utilisé pour mimer le processus d'absorption qui se produit dans l'intestin grêle, mais aucune absorption n'est simulée dans les compartiments coliques (Vermeiren et *al.*, 2011). Les bioréacteurs sont caractérisés par leur pH, leur volume réactionnel et leur temps de résidence. Les sécrétions gastriques et duodénales sont apportées dans les compartiments appropriés. Ainsi, il permet de simuler, en fonction des données *in vivo*, la température, le pH gastrique et intestinal, les sécrétions d'enzymes digestives (pancréatine, bile), le temps de transit et les communautés microbiennes associées aux différentes régions du côlon humain (**FIGURE 23**)





Le système SHIME[®] (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem) est composé de cinq bioréacteurs qui simulent de façon séquentielle l'estomac, l'intestin grêle et les trois régions du côlon.

Alors que le système TIM 1 apparait comme le simulateur le plus approprié pour mimer les paramètres physico-chimiques du tractus digestif supérieur, le système SHIME[®] s'avère particulièrement pertinent pour étudier le devenir métabolique de composés alimentaires et de produits pharmaceutiques sur plusieurs semaines et leur interaction avec le microbiote intestin*al*. Les études réalisées dans le système SHIME[®] depuis 2009 sont répertoriées dans le **TABLEAU 2**.

TABLEAU 2. Études microbiologiques, nutritionnelles, pharmacologiques, toxicologiques, en santé et recherche et développement du SHIME[®].

SHIME [®] (Molly et al., 1993)			
brown Damm Chan	Cikus	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	Références
NUTRITION			
Humaine			
Prébiotiques	*	Effet de prébiotiques sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	Truchado et al , 2015 ; Grootaert et al , 2009 ; Marzorati et al , 2013a, 2010 ; Pollet et al , 2012 ; Sanchez et al , 2009 ; Terpend et al , 2013 ; Van den Abbeele et al , 2013
Polyphénols	*	Dégradation de polyphénols par le microbiote et production d'AGCC	Van Dorsten et al., 2012; Sanchez-Patán et al., 2015
	*	Impact de Lactobacillus plantarum sur la bioaccessibilité de polyphénols alimentaires	Barroso et al., 2014 ; Barroso et al., 2013
	*	Effet des polyphénols sur le microbiote et la production d'AGCC	Kemperman et al., 2013
Acides gras	*	Effet de l'acide linoléique sur la prévalence et la survie de <i>Lactobacillus reuteri</i> dans le mucus	De Weirdt et al., 2013
MICROBIOLOGIE			
Micro-organismes prot	piotiq	ues	
Bactériens	*	Influence d' <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 sur la composition du microbiote intestinal et la production d'AGCC	Sivieri et al., 2011
	*	Influence de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CRL 1014 sur la composition du microbiote intestinal et la production d'AGCC	Sivieri et al., 2013
	*	Influence de Lactobacillus casei 01 sur la composition du microbiote intestinal	Worametrachanon et al., 2014
	*	Interindividual differences in response to treatment with butyrate-producing <i>Butyricicoccus pullicaecorum</i> 25-3T studied in an in vitro gut model.	Geirnaert et al., 2014; 2015
	\$	Influence de la matrice alimentaire sur la libération de probiotiques micro-encapsulés	Possemiers et al., 2010
Levuriens	*	Effet d'un dérivé de Saccharomyces cerevisiae sur la composition du microbiote intestinal	Possemiers et al., 2013
Micro-organismes path	ogèn	ies	
Bacillus cereus	*	Survie de Bacillus cereus, capacité à sporuler et à produire des toxines dans l'environnement gastro-intestinal et influence sur la composition du microbiote intestinal	Ceuppens et <i>al.</i> , 2010, 2012a,b,c
Colonisation et compos	ition	du microbiote	
	*	Étude du processus de colonisation du système par une microflore stable	Van den Abbeele et al., 2010
	*	Étude du processus de colonisation du mucus par les lactobacilles	Van den Abbeele et al., 2012b
	*	Étude de la composition du microbiote mucosal et son rôle dans la production du butyrate	Van den Abbeele et al., 2012a, 2009
	*	Influence du temps de transit sur le microbiote intestinal	Rodes et <i>al.</i> , 2011
Activité métabolique du	u mie	robiote	
	*	Étude des interactions entre les bactéries productrices d'equol, les méthanogènes et les bactéries sulfato-réductrices	Bolca et Verstraete, 2010
	*	Effet des glucides sur le métabolisme du glycérol	De Weirdt et al., 2010
	*	Mise en évidence de la voie métabolique impliquée dans la formation d'oxyde nitrique par le microbiote	Vermeiren et al., 2009
	*	Effet de composés alimentaires sur la production d'oxyde nitrique par le microbiote	Vermeiren et al., 2012a

TABLEAU 2. Études microbiologiques, nutritionnelles, pharmacologiques, toxicologiques, en santé et recherche et développement du SHIME[®] (suite et fin)

		SHIME [®] (Molly et al., 1993	3)
EURORE DEELE CASE	Citers Citers	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	Références
Pharmacologie			
Galénique	*	Évaluation de la libération de composés micro-encapsulés	Almeida et <i>al.</i> , 2011 ; H. Chen et <i>al.</i> , 2010 ; Rodes et <i>al.</i> , 2014
Santé			
Réctocolite hémorragique	**	Étude de la composition du microbiote intestinal pour comprendre l'éthiologie de la rectocolite hémorragique	Vermeiren et al., 2012b ; Vigsnaes et al., 2013
	*	Effet de l'inuline sur la bioactivation d'un agent carcinogène (2-Amino-1-methyl-6- phenylimidazo[4,5-b]pyridine) par le microbiote	Vanhaecke et al., 2009
	*	Activité anti-cancéreuse de fructanes dans l'environnement colique humain	Allsopp et al., 2013
TOXICOLOGIE			
Métaux lourds	*	Bioaccessibilité des métaux lourds dans l'environnement colique humain	Laird et al., 2010, 2009 ; Wragg et al., 2011
	*	Volatilisation des métaux lourds par le microbiote	Diaz-Bone et T. R. Van de Wiele, 2009
	*	Biotransformation de l'arsenic dans l'environnement colique humain	Yin et al., 2015 ; Alava et al., 2014 ; Alava et al., 2012 ; T. Van de Wiele et al., 2010
НАР	*	Bioaccessibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques	M. R. Cave et al., 2010 ; Siciliano et al., 2010
Insecticides	*	Effet des insecticides sur le microbiote	Joly et al., 2013
Autres xénobiotiques	*	Influence de la matrice alimentaire sur la bioaccessibilité des polybromodiphényléthers	Yu et al., 2009
Mycotoxines	*	Biodégradation des mycotoxines dans l'environnement colique humain et son influence sur le microbiote et la production d'AGCC	Ouethrani et al., 2013
Recherche et déve	LOPPE	EMENT	
	*	Optimisation d'une méthode de cytométrie en flux pour évaluer la viabilité de bactéries du microbiote	Grootaert et al., 2011
	*	Développement du module HMI (« Host-Microbiota Interaction »)	Marzorati et al., 2014
	*	Simulation de l'environnement mucosal grâce à des microcosmes couverts de mucine	Van den Abbeele et al., 2012b

1.2.1.3. Modèles utilisés pour l'étude de l'écosystème colique

Le microbiote colique est un écosystème complexe difficile à étudier pour des raisons évidentes d'accessibilité et d'éthique. Pour contourner ces difficultés, des modèles animaux et *in vitro* ont été développés afin d'acquérir de nouvelles connaissances sur cet écosystème.

1.2.1.3.1. Modèle *in vivo*

Les modèles animaux conventionnels les plus fréquemment utilisés sont la souris, le rat, le lapin et le porc. Ils permettent d'effectuer différentes études sur le microbiote et la muqueuse intestinale. Cependant, en raison de différences entre la composition du microbiote intestinal humain et animal, des modèles animaux gnotobiotiques ont été développés. Les animaux gnotobiotiques sont des animaux axéniques, microbiologiquement stériles, inoculés expérimentalement. Les animaux inoculés avec des souches bactériennes spécifiques rendent possible l'étude des interactions hôte/bactéries et des interactions bactéries/bactéries. Quant aux animaux inoculés par une flore complexe issue de matière fécale humaine, ces modèles permettent de maintenir un microbiote donné dans un environnement *in vivo* proche des conditions retrouvées dans le côlon humain. Cependant, l'utilisation de modèles gnotobiotiques présente des limites physiologiques (i.e. les conditions physico-chimiques rencontrées dans ces modèles diffèrent significativement de celles de l'Homme) et logistiques (i.e. coût élevé, équipement, personnels qualifiés). Pour offrir une alternative aux expérimentations animales, des modèles *in vitro* ont été développés.

1.2.1.3.2. Modèle *in vitro* de l'environnement colique

De nombreux modèles de fermentation *in vitro* ont été développés afin de reproduire l'environnement colique humain : des modèles « batch » aux modèles mono- ou multi-étagés semi-continu et continu. Il n'existe pas de consensus dans la préparation de l'inoculum fécal, ce dernier pouvant être issu de selles (fraîches ou congelées) d'un seul donneur ou d'un mélange de selles de plusieurs donneurs (Payne et *al.*, 2012). Récemment, il a été montré que les profils bactériens et l'activité fermentaire obtenus en utilisant un mélange de selles de plusieurs donneurs sont comparables à ceux observés avec les selles des donneurs pris indépendamment (Aguirre et *al.*, 2014). L'anaérobiose est maintenue au sein des réacteurs soit par un flux d'azote ou de dioxyde de carbone, soit uniquement par la production des gaz issus de l'activité fermentaire du microbiote. L'absorption passive de l'eau et des métabolites fermentaires est reproduite dans certains systèmes pour empêcher l'accumulation de ces derniers et limiter l'inhibition de l'activité bactérienne (Venema et Van den Abbeele 2013). Afin de mieux appréhender par la suite les avantages et les limites des différents modèles *in vitro* utilisés pour l'étude de l'écosystème microbien colique, les particularités des principaux modèles seront détaillées.

1.2.1.3.2.1. Systèmes de fermentation en « batch »

Les cultures en « batch » sont des modèles statiques. Ces modèles sont généralement des systèmes fermés (i.e. bouteilles ou réacteurs scellés) contenant des cultures bactériennes ou suspensions de matières fécales maintenues sous conditions anaérobies (Venema et Van den Abbeele 2013). Ils permettent de décrire la croissance de cultures bactériennes pures ou en mélange dans un milieu sélectionné sans ajout secondaire de substances nutritives (Payne et *al.*, 2012). Les systèmes de fermentation en « batch » sont bien adaptés pour (i) réaliser un préscreening de souches potentiellement probiotiques, (ii) déterminer à moindre coût l'impact des prébiotiques et des xénobiotiques sur le microbiote intestin*al*. Ils permettent l'étude des profils en AGCC découlant du métabolisme actif de substrats par le microbiote colique (Kim et *al.*, 2011 ; Payne et *al.*, 2012). Cependant, le processus fermentaire entraîne des changements continus de pH et de potentiel redox et l'accumulation de produits toxiques. De plus, la croissance microbienne dans ces systèmes dépend de la densité d'ensemencement et de la vitesse de consommation du substrat. De tels modèles ne peuvent donc être utilisés que pendant de courtes périodes (24 - 48 h). Pour pallier ces limites, dans le cadre d'expérimentations plus longues, des systèmes de fermentation en semi-continu et continu ont été développés.

1.2.1.3.2.2. Systèmes de fermentation en semi-continu ou continu

L'étude du microbiote colique sur des temps plus longs nécessite de créer un état d'équilibre *in vitro*. Les systèmes de fermentation en continu et semi-continu sont des systèmes renouvelés permettant une culture stable d'un microbiote intestinal pendant une période de temps définie et spécifique au modèle, mais pouvant aller jusqu'à plusieurs mois. Ils sont alimentés par un flux (continu ou discontinu) de milieu nutritif et parallèlement une quantité équivalente de milieu fermentaire est éliminée du système. Ainsi, le milieu fermentaire ne se trouve jamais épuisé en substrats et les produits de fermentations ne s'accumulent pas dans le système. Les solutions nutritives utilisées dans la plupart des études sont des adaptations de celle proposée par Macfarlane et collaborateurs simulant les conditions nutritionnelles du chyme iléal arrivant au côlon (Macfarlane et *al.*, 1998). Les modèles de fermentation qui sont décrits dans la littérature possèdent différents niveaux de complexité allant du modèle à un fermenteur au modèle à cinq bioréacteurs en série. Le taux de dilution caractérise l'alimentation du système et correspond à l'inverse du temps de rétention. Ce paramètre important permet de mimer le temps de transit colique :

D = Q/V

où D est le taux de dilution (min⁻¹), Q le débit d'entrée ou de sortie (mL/min) et V le volume constant du bioréacteur (mL).



FIGURE 24. Représentation schématique du système ARCOL

Le système ARCOL (ARtificial COLon) est un système de fermentation semi-continu monoétagé permettant de simuler le côlon dans son ensemble. Il reproduit les paramètres coliques tels que la température corporelle, le pH colique, le temps de rétention, ainsi que l'absorption de l'eau et des métabolites fermentaires par une fibre de dialyse immergée dans le milieu fermentaire. Le maintien de l'anaérobiose résulte uniquement de l'activité du microbiote. Le pH, la température, la pression, l'agitation et l'anaérobiose sont également contrôlés et/ou mesurés dans la plupart des modèles. Parallèlement, le potentiel d'oxydo-réduction peut être suivi.

La majorité des systèmes de fermentation en semi-continu utilisés pour modéliser l'environnement colique humain sont adaptés du système décrit par Miller et Wolin (1981). L'un de ces modèles a été développé au sein de l'EA-CIDAM : ARCOL (pour ARtificial COLon) et a été retenu comme modèle d'étude dans le cadre de cette thèse. Le principe de ce modèle repose sur la culture d'un microbiote fécal, dans un système mono-étagé parfaitement agité. Il est destiné à simuler le côlon dans son ensemble à partir d'un inoculum fécal frais d'un unique donneur. Le pH, la température et le temps de rétention sont contrôlés, et la pression et le potentiel d'oxydo-réduction sont mesurés. L'anaérobiose est maintenue au sein du réacteur uniquement par la production des gaz issus de l'activité fermentaire du microbiote. Ce système possède également une fibre de dialyse, immergée dans le milieu fermentaire, permettant de reproduire l'absorption passive de l'eau et des produits de fermentation (**FIGURE 24**). Le système ARCOL a été développé et validé pour des applications chez l'animal (Gérard-Champod et *al.*, 2010) et chez l'Homme (Blanquet-Diot et *al.*, 2012).

Le développement d'un modèle de fermentation continu multi-étagé par Gibson et collaborateurs a permis de simuler les conditions physico-chimiques et la disponibilité en substrats présents dans les différentes régions du côlon humain, i.e. les régions ascendante, transverse et descendante (Gibson et *al.*, 1988). Par la suite, ce système a été validé pour les études du métabolisme du microbiote colique humain (Macfarlane et *al.*, 1998). Parallèlement, d'autres équipes ont conçu leur modèle. Parmi les systèmes développés, les plus populaires sont : le SHIME[®] détaillé précédemment (Molly et *al.*, 1993), le modèle « Lacroix » (Cinquin et *al.*, 2004), l'EnteroMix[®] (Makivuokko et *al.*, 2005) et le TIM 2 (Minekus et *al.*, 1999).

Systèmes fermentaires en mode semi-continu				
	TIM 2 (Minekus et <i>al.</i> , 1999)	EnteroMix [®] (Makivuokko et <i>al.</i> , 2005)	ARCOL (Blanquet-Diot et <i>al.</i> , 2012; Gérard-Champod et <i>al.</i> , 2010)	
		tree tree		
Nombre de compartiments	1 à 3 compartiments	4 bioréacteurs	1 bioréacteur	
AGITATION	Brassage par jeu de pression sur une paroi flexible	Non communiqué	Module d'agitation avec doubles hélices pour brassage de l'atmosphère et du milieu fermentaire	
Anaérobie	Flux	de N ₂	Activité fermentaire du microbiote	
INOCULUM	Mélange de selles fraîches	Selle fraîche d'u	n unique donneur	
Dialyse	Oui	Non	Oui	

TABLEAU 3. Principaux modèles *in vitro* coliques en mode semi-continu et leurs caractéristiques

Ne sont pas notés les paramètres communs à tous les systèmes (i.e. le contrôle de la température, du pH et du temps de transit). ARCOL : ARtificial COLon ; N_2 : azote ; TIM 2 : TNO Gastrointestinal Model 2.

TABLEAU 4. Principaux modèles in vitro coliques en mode continu et leurs caractéristiques

Systèmes fermentaires en mode continu				
	SHIME® (Molly et <i>al.</i> , 1993)	Macfarlane et Gibson (G. T. Macfarlane et <i>al.</i> , 1998)	Lacroix (Cinquin et <i>al.</i> , 2004)	
	and the second s		Milicu nutritif	
Nombre de compartiments	5 bioréacteurs	3 bioréacteurs	1 à 3 bioréacteurs	
AGITATION		Barreau magnétique		
ANAÉROBIE	Flux de N2	Flux d	x de CO ₂	
INOCULUM	Selle fraîche d'un unique donneur	Mélange de selles fraîches	Selles immobilisées (essentiellement d'enfants) sur billes de gommes gellane et xanthane	
DIALYSE		Non		

Ne sont pas notés les paramètres communs à tous les systèmes (i.e. le contrôle de la température, du pH et du temps de transit). SHIME[®] : Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem ; CO_2 : dioxyde de carbone ; N_2 : azote

Le modèle « Lacroix » conçu à l'Eidgenössische Technische Hochschule (Zurich, Suisse) a la particularité d'utiliser un microbiote immobilisé, essentiellement issu de selles d'enfants, sur des billes de gommes gellane et xanthane. L'immobilisation cellulaire vise à retenir physiquement une population microbienne dans le système de fermentation. Cette technique est principalement utilisée pour obtenir une culture avec une haute densité cellulaire ainsi qu'une stabilité et une biocatalyse renforcée, par exemple pour la biosynthèse de certains composés d'intérêt (enzymes, acides organiques, protéines, biomasse,...).

L'EnteroMix[®] développé par Danisco (Kantvik, Finlande) est composé de quatre bioréacteurs pouvant fonctionner parallèlement en utilisant le même inoculum fécal (et ainsi simuler quatre conditions d'études différentes) ou mimer les régions ascendante, transverse, descendante et sigmoïde du côlon.

Enfin, l'EA-CIDAM a récemment validé un système tri-étagé : l'ECSIM pour Environmental Control System for Intestinal Microbiota (Feria-Gervasio et *al.*, 2014). Ce modèle est basé sur celui de Macfarlane et *al.* (1998) mais son anaérobiose est maintenue au sein du réacteur uniquement par la production des gaz issus de l'activité fermentaire du microbiote. Parallèlement au développement de modèles en bioréacteurs, Minekus et *al.* (1999) ont conçu un modèle simulant l'environnement colique sur le même principe que le système digestif artificiel TIM 1. Le TIM 2 pour TNO Gastrointestinal Model 2 (Zeist, Pays-Bas) a la particularité de mimer les mouvements péristaltiques grâce à de l'eau sous pression et l'absorption passive de l'eau et des produits de fermentation via une fibre de dialyse.

Les caractéristiques des principaux modèles de fermentation **semi-continus** et **continus** sont détaillées respectivement dans les **TABLEAUX 3** et 4.

L'ensemble des paramètres de ces systèmes peuvent être contrôlés et ajustés. Il est alors possible de simuler aussi bien l'environnement colique de l'Homme (e.g. enfant, adulte ou personne âgée) que celle d'animaux (e.g. porc ou veau pré-ruminant). Ces modèles de fermentation sont utilisés dans le cadre d'études nutritionnelles, pharmacologiques, toxicologiques et microbiologiques. Ils permettent d'étudier sur plusieurs semaines, voire sur plusieurs mois, le devenir métabolique de composés alimentaires, pharmaceutiques ou de xénobiotiques, la survie de micro-organismes probiotiques ou pathogènes et leur interaction avec le microbiote intestinal. Les publications dans lesquelles sont utilisés ces modèles coliques 2009 semi-continus et continus depuis sont présentées respectivement dans les TABLEAUX 5 et 6.

TABLEAU 5. Applications des principaux modèles in vitro coliques semi-continus

	ENTEROMIX [®] (Makivuokko et al., 2005)			
Jalas weight	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	Références		
NUTRITION				
Humaine				
Prébiotiques	♦ Influence des xylo-oligosaccharides sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	Mäkeläinen et al., 2010		
	 Évaluation de la capacité à induire l'apoptose de cellules coliques cancéreuses par des mé fermentaires de poly-dextrose 	tabolites Putaala et <i>al.</i> , 2011		
MICROBIOLOGIE				
Micro-organismes probi	otiques			
Bactériens	Influence de la matrice alimentaire sur la survie de Lactobacilles et sur l'effet du probiotiqu microbiote intestinal et la production d'AGCC	ue sur le Mäkeläinen et <i>al.</i> , 2009 ; Mäkivuokko et <i>al.</i> , 2010		
Symbiotiques	Effet de symbiotiques sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	Van Zanten et al., 2012		
	ARCOL (Blanquet-Diot et al., 2012 ; Gérard-Champod	et al., 2010)		
~¥	O BJECTIFS DE L'ÉTUDE	Références		
NUTRITION				
Animale				
Additif alimentaire	 Validation du modèle pour l'étude d'additifs alimentaires sur le microbiote intestinal et la pro d'AGCC 	oduction Gérard-Champod et <i>al.</i> , 2010		
MICROBIOLOGIE				
Micro-organismes probi	otiques			
Levuriens	♦ Influence du mode et de la fréquence d'administration sur la survie de Saccharomyces cerevisiae	Blanquet-Diot et al., 2012		
	Survie et influence de Saccharomyces cerevisiae CNCM I-3856 sur le microbiote colique humain	Cordonnier et al., 2015		
Micro-organismes patho	gènes			
<i>Escherichia coli</i> entérohémorragique	Survie d' <i>E. coli</i> O157:H7 et influence de souches probiotiques	Thévenot et <i>al.</i> , 2013, 2015		
	TIM 2 (Minekus et al., 1999)			
	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	Références		
NUTRITION				
Humaine				
Prébiotique	Effet de prébiotiques sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	A. J. Maathuis et <i>al.</i> , 2012 ; Van den Abbeele et <i>al.</i> , 2013		
Composés phénoliques	 Métabolisme de composés phénoliques non-bioaccessibles 	Anson et <i>al.</i> , 2009a		
Glycosides	 Bioconversion des ginsenosides par le microbiote intestinal humain 	H. Kong et al., 2009		
Fibres	Effet des fibres alimentaires sur la composition du microbiote intestinal et la production d'AGCC	Anson et <i>al.</i> , 2011 ; A. Maathuis et <i>al.</i> , 2009 ; Tabernero et <i>al.</i> , 2011		
MICROBIOLOGIE				
Micro-organismes probi	otiques			
Bactériens	Effet de probiotiques associés à la clandamycine sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	Rehman et <i>al.</i> , 2012		
Symbiotiques	$\diamond~$ Effet de symbiotiques sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	Martinez et al., 2013		
Métabolisme				
	 Étude de la diversité du microbiote intestinal humain 	Rajilic-Stojanovic et al., 2010		
	 Identification des bactéries fermentant l'amidon dans l'environnement colique humain 	Kovatcheva-Datchary et al., 2009		
	 Effet des glucides sur la production d'AGCC 	De Graaf et <i>al.</i> , 2010		
Santé				
Syndrome du côlon irritable	Effet de micro-sphères d'amidon sur le microbiote intestinal de patients atteints de maladie inflammatoire chronique de l'intestin	Rose et <i>al.</i> , 2010		

	MACFARLANE ET GIBSON (G. T. Macfarlane et al., 1998)		
	O BJECTIFS DE L'ÉTUDE	Références	
NUTRITION			
Humaine			
Prébiotiques	Effet de prébiotiques sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	Hobden et <i>al.</i> , 2013 ; Hongpattarakere et <i>al.</i> , 2012 ; Maccaferri et <i>al.</i> , 2012 ; Nakashimada et <i>al.</i> , 2011 ; Sarbini et <i>al.</i> , 2013 ; Shen et <i>al.</i> , 2012	
Composés phénoliques	Effet de composés phénoliques sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	Fogliano et al., 2011	
MICROBIOLOGIE			
Micro-organismes probi	iotiques		
Bactériens	 Effet de probiotiques sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC et sur la sporulation de Clostridium difficile 	Honda et <i>al.</i> , 2011	
	Effet de probiotiques bactériens sur la capacité du microbiote intestinal à adhérer et à réguler la synthèse de cytokines	Bahrami et al., 2011	
	Effet anti-bactérien de probiotiques bactériens combinés avec des galactosides	Figueroa-González et al., 2010	
Levuriens	Effet de probiotiques sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	Maccaferri et al., 2012a	
Symbiotiques	 Effet de symbiotiques sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC 	Likotrafiti et al., 2014	
Micro-organismes patho	gènes .		
Staphylococcus aureus	 Effet de Staphylococcus aureus sur le microbiote intestinal 	Sannasiddappa et al., 2011	
Clostridium difficile	 Effet des antibiotiques sur la survie de Clostridium difficile, la germination et la production de toxines 	Baines et <i>al.</i> , 2011, 2009b; Chilton et <i>al.</i> , 2014a,b; Crowther et <i>al.</i> , 2013; Freeman et <i>al.</i> , 2012; Saxton et <i>al.</i> , 2009	
	Capacité d'un polymère (tolevamer) à neutraliser les cytotoxines de Clostridium difficile	Baines et al., 2009a	
	Étude de l'effet d'un bactériophage sur Clostridium difficile	Meader et al., 2013	
COLONISATION ET COM	APOSITION DU MICROBIOTE		
	✤ Influence du pH sur le microbiote intestinal	Duncan et al., 2009	
ACTIVITĖ MĖTABOLIQU	JE DU MICROBIOTE		
	Métabolisme du lactate dans l'environnement colique humain	Belenguer et al., 2011	
SANTÉ			
Maladie de Crohn	Effet de la rifaximine sur le microbiote intestinal de patients atteints de la maladie de Crohn	Maccaferri et al., 2010	

TABLEAU 6. Applications des principaux modèles in vitro coliques continus

	LACROIX (Cinquin et al., 2004)	
	O BJECTIFS DE L'ÉTUDE	Références
NUTRITION		
Humaine		
Prébiotiques	* Effet des fructanes sur le microbiote intestinal de l'enfant	Le Blay et al., 2010
Minéraux	* Effet du fer sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	Dostal et al., 2013
Régimes alimentaires	Influence de l'apport énergétique du régime alimentaire sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	Payne et al., 2012a
MICROBIOLOGIE		
Micro-organismes probio	tiques	
Bactériens	Effet de Bifidobacterium thermophilum RBL67 et d'Escherichia coli L1000 sur la survie de Salmonella typhimurium	Zihler et al., 2010, 2011
	* Effet anti-oxydant de Lactobacilli et leur influence sur le microbiote intestinal	Sun et al., 2010a
Micro-organismes pathog	gènes	
Salmonella typhimurium	Effet de l'amoxicilline sur la survie de Salmonella typhimurium et influence sur la composition du microbiote intestinal et la production d'AGCC	Le Blay et al., 2009
	Effet de Bifidobacterium thermophilum RBL67 et d'Escherichia coli L1000 sur la survie de Salmonella typhimurium	Zihler et al., 2010, 2011
	Effet du fer sur l'adhésion et l'invasion de Salmonella typhimurium	Dostal et al., 2014
Listeria ivanovii	$\diamond~$ Effet de bactériocines produits par Pediococcus acidilactici UL5 sur Listeria ivanovii	Le Blay et <i>al.</i> , 2012
COLONISATION ET COM	POSITION DU MICROBIOTE	
	Processus de transfert horizontal de gènes impliqués dans l'antibio-résistance dans l'environnement colique humain	Haug et <i>al.</i> , 2011
	* Effet du pH sur le microbiote intestinal et la production d'AGCC	Zihler Berner et al., 2013
RECHERCHE ET DÉVELOPPE	MENT	
Animal	Adaptation du modèle pour simuler le côlon proximal du porc	Tanner et <i>al.</i> , 2014

TABLEAU 6. Applications des principaux modèles in vitro coliques continus (suite et fin)

1.2.2. Avantages et limites des systèmes de digestion in vitro

Suite à la mise en place dans l'Union Européenne de la règle des 3 R (réduire, raffiner, remplacer) constituant le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale, les pressions du législateur comme celles de l'opinion publique encouragent le développement de méthodes dites « alternatives » (Combrisson, 2014).

Les outils *in vitro* permettent de réaliser des expériences préliminaires, de contourner ou de compléter des expériences *in vivo*. Ainsi, les modèles de digestion artificielle présentent l'avantage de permettre (i) une reproductibilité des expériences, (ii) la réalisation d'études techniquement ou éthiquement impossibles chez l'Homme (i.e. études portant sur des



FIGURE 25. Modélisation de l'environnement mucosal et des interactions hôte-microorganismes

(A) Le compartiment supérieur du module HMI est couplé en continu avec le milieu fermentaire provenant des bioréacteurs. Le compartiment inférieur est en aérobiose et contient une culture d'entérocytes simulant l'hôte. Les deux compartiments sont séparés par une membrane semi-perméable sur laquelle une mince couche de mucine-agar est coulée (Modifié d'après Marzorati et *al.*, 2014).
(B) Des microcosmes (9 mm de diamètres) couverts d'un mélange d'agar et de mucine de type II sont ajoutés dans chaque bioréacteur colique pour simuler l'environnement mucosal (d'après Van Den Abbeele et *al.*, 2014).

HMI: Host-Microbiota Interaction ; M-SHIME: Mucosal SHIME

substances toxiques ou des micro-organismes pathogènes), (iii) la conduite d'études de préscreening lors du développement de nouveaux produits.

Néanmoins, la digestion est un processus extrêmement complexe faisant intervenir de nombreux facteurs impossibles à modéliser dans un modèle in vitro. En effet, il n'est pas possible de reproduire in vitro les phénomènes immunologiques, le contrôle nerveux et hormonal de la digestion ou encore l'absorption active des produits de digestion. Une des principales limites des systèmes in vitro simulant le tractus digestif supérieur humain, à l'exception du SHIME[®], est l'absence de microbiote au sein des compartiments reproduisant l'intestin grêle. Actuellement, des expériences visant à implanter et stabiliser un microbiote iléal dans le système TIM 1 sont en cours de développement (Stolaki 2010). De plus, la plupart des systèmes coliques développés reproduisent uniquement l'environnement de la lumière intestinale. En réponse à cette limite, Macfarlane et collaborateurs ont introduit, dans les bioréacteurs du système de Macfarlane et Gibson, des tubes en verre contenant un gel de mucine porcine afin de reproduire l'adhésion bactérienne à la couche de mucus de la paroi intestinale (Macfarlane et al., 2005). Parallèlement, Van den Abbeele et al. (2012) ont développé le M-SHIME (pour Mucosal SHIME) en incorporant un environnement mucosal dans le système SHIME[®] à l'aide de microcosmes couverts de mucine introduits dans chaque bioréacteur colique (Van den Abbeele et al., 2012).

Par ailleurs, certains modèles ont été couplés avec des cellules intestinales en culture, comme le système TIM 1 (Déat et *al.*, 2009), le système de Macfarlane et Gibson (Bahrami et *al.*, 2011), le modèle « Lacroix » (Dostal et *al.*, 2014) et le SHIME[®] (Marzorati et *al.*, 2014) dans le but d'étudier la biodisponibilité de composés d'intérêt ou les interactions hôtemicrobiote. En particulier, un modèle bi-compartimenté, le HMI (pour Host-Microbiota Interaction) a été développé, afin d'étudier l'interaction hôte-microorganismes indirecte dans le tractus gastro-intestinal (**FIGURE 25**). Le compartiment inférieur est en aérobiose et contient une culture d'entérocytes simulant l'épithélium colique de l'hôte, tandis que le compartiment supérieur simule le côté luminal du tractus digestif couplé en continu avec le milieu fermentaire sous anaérobiose. Les deux compartiments sont séparés par une double couche fonctionnelle composée d'une couche de mucus disposée sur une membrane de polyamide semi-perméable. Cette double couche permet : (i) de fournir une zone muqueuse pouvant être colonisée par les bactéries intestinales, (ii) le transport bilatéral de métabolites de faible poids moléculaire, (iii) dans le but de créer des conditions micro aérophiles et (iv) de protéger les entérocytes de l'exposition directe au microbiote colique et à ses effets toxiques. Ce nouveau module a été testé pendant une période de 48 h maximum en combinaison avec le SHIME[®] mais, en principe, il peut également être combiné avec d'autres simulateurs de tractus gastro-intestinal disponibles sur le marché (Marzorati, Possemiers, et *al.* 2014; Marzorati, Vanhoecke, et *al.*, 2014; Vermeiren et *al.*, 2011).

Ainsi, la sélection du modèle approprié exige une évaluation soigneuse des objectifs de l'étude et des avantages et limites décrits pour chacun des systèmes (Payne et *al.*, 2012; Venema et Van den Abbeele 2013).

CHAPITRE 2 :

Les Escherichia coli entérohémorragiques

SOMMAIRE

2.1.	Escherichia coli : Taxonomie et définitions	58
2.1.	. Caractères généraux	
2.1.	2. Classification antigénique	
2.1.	Différents pathovars	59
2.2.	Aspects cliniques et épidémiologiques des infections à EHEC	63
2.2.	. Historique	63
2.2.	2. Réservoirs et vecteurs	63
2.2.	Aspects cliniques	64
2.2.	Aspects épidémiologiques	66
2.3.	Facteurs de virulence et pouvoir pathogène	73
2.3	. Shiga-toxines	73
2.3	2. Résistance à l'acidité	80
2.3	Facteurs d'adhésion	81
2.3	Autres facteurs de virulence	89
2.3	Régulation par les facteurs environnementaux du tractus digestif humain	89
2.4.	Diagnostic et stratégies thérapeutiques des infections à EHEC	97
2.4	. Diagnostic	97
2.4	2. Stratégies thérapeutiques	99

2.1. *Escherichia coli* : Taxonomie et définitions

2.1.1. Caractères généraux

En 1885, le pédiatre allemand Théodore Escherich isole et décrit pour la première fois le bacille Bacterium coli commune, fréquemment présent dans les selles des nourrissons. En 1919, Castellani et Chalmers proposent de renommer cette bactérie *Escherichia coli (E. coli)* en hommage aux travaux d'Escherich (Shulman et *al.*, 2007). Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*.

Les bactéries de l'espèce *E. coli* font partie du sous-groupe des γ -protéobactéries commensales du microbiote intestinal humain et de la plupart des animaux à sang chaud. *E. coli* colonise le tractus digestif des nourrissons dès les premières heures suivant l'accouchement. L'abondance des *Proteobacteria* (incluant les *E. coli*) dans le microbiote intestinal humain est d'environ 0,1% des bactéries totales (Eckburg et *al.*, 2005). *E. coli* est considéré comme un hôte normal du microbiote intestinal des mammifères et des oiseaux et est, à ce titre, recherché dans les aliments comme indicateur de contamination fécale.

Les bactéries qui constituent cette famille sont des bacilles à Gram négatif non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs et oxydase négatif. En plus de l'espèce *E. coli*, le genre *Escherichia* comprend quatre autres espèces : *E. albertii, E. fergusonii, E. hermanii* et *E. vulneris*. Chaque espèce d'*Escherichia* présente des caractéristiques biochimiques propres permettant de les différencier.

2.1.2. Classification antigénique

Développée dès 1947, la technique de sérotypage a permis de distinguer les différentes souches d'*E. coli*. Une classification antigénique a été établie sur la base des antigènes lipopolysaccharidiques de paroi O (permettant de définir l'appartenance à un sérogroupe), des antigènes polysaccharidiques de capsule K et des antigènes protéiques flagellaires H, les différents sérotypes résultant des combinaisons O:H.

2.1.3. Différents pathovars

Bien que *E. coli* soit considéré comme un hôte normal du microbiote intestinal, certaines souches d'*E. coli* ont acquis des facteurs de virulence ou des mutations pathoadaptatives les rendant pathogènes pour l'Homme. Les souches d'*E. coli* à l'origine d'infections extraintestinales sont regroupées sous le terme de ExPEC (*E. coli* pathogènes extra-intestinaux), qui comportent les *E. coli* uropathogènes (UPEC) responsables d'infections du tractus urinaire, et les *E. coli* associés à des méningites et/ou à des septicémies (MNEC).

Les autres souches d'*E. coli*, regroupées sous le terme de InPEC (*E. coli* pathogènes intestinaux), peuvent être à l'origine d'infections intestinales. Parmi les souches responsables de diarrhées, huit pathovars d'*E. coli* ont été décrits sur la base de leurs facteurs de pathogénicité et des signes cliniques engendrés (**TABLEAU 8**), i.e. *E. coli* entéropathogènes (EPEC), *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), *E. coli* entéroagrégatifs (EAggEC), *E. coli* adhésion diffuse (DAEC), *E. coli* adhérents et invasifs (AIEC), *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) et *E. coli* entéroagrégatifs producteurs de Shiga-toxines (STEAEC).

CLASSE	SIGNES CLINIQUES	Facteurs de pathogénicité
E. coli entéropathogènes (EPEC)	Diarrhée aqueuse	Facteurs d'adhésion (BFP) Lésions d'attachement-effacement
E. coli entérotoxinogènes (ETEC)	Diarrhée aqueuse (<i>tourista</i>)	Facteurs d'adhésion (CFA) Entérotoxines thermolabiles Entérotoxines thermostables
E. coli entéroinvasifs (EIEC)	Diarrhée dysentérique	Invasion des cellules épithéliales
E. coli entéroagrégatifs (EAggEC)	Diarrhée persistante	Facteurs d'adhésion (AAF/1) Entérotoxines (EAST)
E. coli à adhésion diffuse (DAEC)	Diarrhée aqueuse	Facteurs d'adhésion (F1845, AIDA-1)
E. coli adhérents et invasifs (AIEC)	Diarrhée chronique Maladie de Crohn	Adhésion et invasion
E. coli entérohémorragiques (EHEC)	Diarrhée aqueuse puis colites hémorragiques SHU PTT	Toxines (Stx1 et/ou 2) Lésions d'attachement-effacement
<i>E. coli</i> entéroagrégatifs producteurs de Shiga-toxines (STEAEC)	SHU	Toxines (Stx2) Facteur d'adhésion

TABLEAU 7. Les huit classes d'E. coli responsables de diarrhées chez l'Homme

AAF/1 : adhesin involved in diffuse adherence ; **AIDA-1** : adhesin involved in diffuse adherence ; **BFP** : bundle forming pili ; **CFA** : colonization factor antigen ; **EAST** : enteroaggregative *E. coli* heat stable enterotoxin ; **PTT** : purpura thrombotique thrombocytopénique ; **SHU** : syndrome hémolytique et urémique ; **Stx** : Shiga-toxine

L'analyse phylogénétique des *E. coli* a permis de les classer en cinq groupes majeurs, à savoir : A, B1, B2, D et E (**FIGURE 26**). Les *E. coli* des phylogroupes A et B1 sont majoritairement retrouvés chez les Hommes et les animaux tandis que ceux appartenant aux phylogroupes B2 et D sont minoritaires et souvent impliqués dans des pathologies bactériennes.



FIGURE 26. Arbre phylogénétique des *E. coli* entéropathogènes (D'après Croxen et *al.*, 2013)

Les souches d'*E. coli* entéropathogènes peuvent être regroupées en 5 groupes phylogénétiques majeurs : A (bleu), B1 (vert), B2 (brun), D (rose), et E (rouge). Les Shigella et les *E. coli* entéroinvasifs sont dans des groupes phylogénétiques supplémentaires en noir. AIEC : *E. coli* adhérents et invasifs ; EAEC : *E. coli* entéroagrégatifs ; EPEC : *E. coli* entéropathogènes ; ETEC : *E. coli* entérotoxinogènes ; STEC : *E. coli* producteurs de shigatoxines Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) sont responsables de diarrhées infantiles (enfants de moins de 3 ans). Le pouvoir pathogène des EPEC est dû à la capacité d'adhérer aux entérocytes de l'intestin grêle et l'induction de lésions histopathologiques dites «d'attachement effacement (A/E)». L'adhésion des EPEC à la surface des entérocytes au niveau de la bordure en brosse grâce à des pili BFP (« bundle forming pili ») est suivie d'une désorganisation du cytosquelette de la cellule hôte entraînant un effacement des microvillosités et la formation d'une zone étroite de contact formant un piédestal entre les EPEC et l'épithélium intestin*al*. Les gènes impliqués dans ce phénotype sont localisés au niveau d'un îlot de pathogénicité, le locus d'effacement des entérocytes (LEE), et comprennent le gène *eae* codant l'intimine.

Les *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC) sont responsables de la diarrhée du voyageur ou « turista » et de diarrhées infantiles dans les pays en voie de développement. Les ETEC sont capables de coloniser la partie proximale de l'intestin grêle grâce à des facteurs de colonisation fimbriaires spécifique d'espèce, les CFA (« colonization factor antigen ») n'induisant pas de destruction des microvillosités, et produisent des entérotoxines thermolabiles et/ou thermostables provoquant une sécrétion active d'eau et d'électrolytes.

Les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) sont responsables de diarrhées aqueuses pouvant évoluer vers un syndrome dysentérique. Le pouvoir pathogène des EIEC est dû essentiellement à leur capacité à envahir les cellules épithéliales intestinales. La stratégie d'infection et le mécanisme de virulence sont similaires à ceux des Shigelles, par translocation via les cellules M des plaques de Peyer, invasion et multiplication dans les entérocytes puis atteinte de la *lamina propria*.

Les *E. coli* entéroagrégatifs (EAggEC) sont responsables d'infections digestives analogues à celles dues aux EPEC mais plus persistantes. Ces souches sont caractérisées par un phénotype d'adhésion agrégatif en formant des « amas en mur de brique ». Cette adhésion est associée à la présence de gènes plasmidiques codant des structures fimbriales flexibles, les AAF/1 (« aggregative adherence fimbriae 1 »). De plus, certaines souches produisent l'entérotoxine thermostable EAST (« enteroaggregative *E. coli* heat stable enterotoxin »).

Les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) sont responsables de diarrhées pouvant être aqueuses et contenir du mucus, essentiellement chez les jeunes enfants (entre 1 et 5 ans). Deux groupes de facteurs d'adhésion confèrent un phénotype d'adhésion « diffuse », les adhésines

du groupe Afa/Dr dont l'adhésine fimbriale F1845 et une protéine de membrane externe, AIDA-1 (« adhesin involved in diffuse adherence »).

Les *E. coli* adhérents et invasifs (AIEC) ont été isolés de biopsies de muqueuse iléale chez des patients atteints de la maladie de Crohn. Ces bactéries sont capables d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales. L'adhésion des AIEC à la surface des entérocytes est possible grâce à la reconnaissance du récepteur CEACAM6 (« carcinoembryonic antigenrelated cell adhesion molecule 6 ») par les pili de type 1. De plus, ces souches présentent non seulement la capacité de survivre mais également de se multiplier dans les macrophages en induisant une forte sécrétion de TNF- α (« tumor necrosis factor α »).

Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont définis comme étant le sous-groupe pathogène pour l'Homme des *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). Les EHEC sont responsables de troubles allant de la diarrhée aqueuse à la colite hémorragique. Dans les cas les plus graves, ces signes digestifs peuvent être associés à une insuffisance rénale sévère, le syndrome hémolytique et urémique ou « SHU », ou à un purpura thrombotique thrombocytopénique (« PTT ») parfois accompagné d'une atteinte du système nerveux centr*al.* Le pouvoir pathogène des EHEC est dû essentiellement à la production de Shiga-toxines 1 et/ou 2 et à l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales via l'intimine. Par ailleurs, Les facteurs de virulence et le pouvoir pathogène des EHEC seront détaillés dans la partie 2.3.

Les *E. coli* entéroagrégatifs producteurs de Shiga-toxines (STEAEC) ont été décrits suite à une épidémie en Europe en 2011, dont le foyer initial était l'Allemagne et impliquait des graines germées de fenugrec contaminées par la souche O104:H4. Les STEAEC ne semblent pas présenter de nouveaux facteurs de virulence mais plutôt une combinaison de ceux des EHEC et des EAggEC ; ils résulteraient de l'insertion des phages portant les gènes *stx* dans le génome d'une souche EAggEC. Leur pouvoir pathogène est dû essentiellement à une très forte adhésion aux cellules de l'épithélium intestinal sous la dépendance du gène *aggR*, codant un facteur de régulation de l'expression de fimbriae, et à la production de Shiga-toxine 2. Cette souche a la particularité de ne pas posséder dans son génome les gènes *eae* (codant l'intimine), *hlyA* (codant l'hémolysine A) et *astA* (codant l'EAST).

2.2. Aspects cliniques et épidémiologiques des infections à EHEC

2.2.1. Historique

La classification des EHEC comme un pathovar distinct au sein des *E. coli* pathogènes résulte d'observations épidémiologiques et cliniques. En 1982, deux épidémies de colites hémorragiques survenues dans le Nord des États-Unis ont été associées à l'ingestion de hamburgers insuffisamment cuits. Une souche d'*E. coli* de sérotype alors inhabituel (O157:H7) a été isolée à la fois dans les selles des patients et dans la viande de bœuf du lot des hamburgers incriminés (Karmali et *al.*, 1983 ; Riley et *al.*, 1983). En 1985, la relation entre la présence d'*E. coli* O157:H7 produisant des Shiga-toxines dans les selles d'enfants et les signes cliniques, i.e. les colites hémorragiques et le SHU, est établie (Karmali et *al.*, 1983). Ainsi, deux observations microbiologiques et cliniques clés lors d'épidémies, l'une basée sur une bactérie *E. coli* de sérotype rare et l'autre basée sur la production d'une cytotoxine spécifique, ont conduit à la reconnaissance d'une nouvelle classe d'agents pathogènes entériques responsables d'une maladie caractérisée par des signes intestinaux et rénaux.

2.2.2. Réservoirs et vecteurs

Le tube digestif des ruminants domestiques, et plus particulièrement des bovins, est le principal réservoir des STEC. Chez ces animaux, le portage est asymptomatique et ils participent à la contamination de l'environnement via leurs fèces. Une étude épidémiologique menée sur une année en Auvergne a montré que plus de 70% des bovins hébergent des STEC (Pradel et *al.*, 2000). Plus récemment, une autre étude a montré qu'en France, 1,8 % des bovins aux abattoirs hébergent au moins l'un des cinq sérotypes STEC considérés comme hautement pathogènes pour l'Homme à savoir O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 et O145:H28 (Bibbal et *al.*, 2015). Entre 0,4 et 3% des carcasses bovines seraient contaminées par *E. coli* O157:H7 dans les abattoirs eurasiens (Carney et *al.*, 2006 ; Gun et *al.*, 2003 ; Guyon et *al.*, 2001 ; Rhoades et *al.*, 2009). Dans une moindre mesure, d'autres animaux d'élevage (agricole et zoo) ou sauvages peuvent être porteurs sains de STEC (Ferens et Hovde 2011 ; Mohammed Hamzah et *al.*, 2013).

La majorité des épidémies recensées à ce jour est liée à l'ingestion de denrées animales ou d'origine animale contaminées par des EHEC. La viande de bœuf insuffisamment cuite constitue la principale source de contamination. D'autres aliments ont été incriminés tels que les produits laitiers et jus de fruits non pasteurisés, légumes crus et graines germées (Gouali et Weill 2013). Les autres modes de transmission des infections à EHEC chez l'Homme sont la transmission interhumaine et le contact direct avec des animaux porteurs et excréteurs de ces bactéries (**FIGURE 27**).



FIGURE 27. Flux de STEC et voies de contamination de l'Homme par les EHEC (D'après Brugère et *al.*, 2012)

2.2.3. Aspects cliniques

L'évolution clinique des infections à EHEC est schématisée dans la **FIGURE 28**. La période d'incubation est en moyenne de deux à dix jours. La principale manifestation clinique est la colite hémorragique se caractérisant par des crampes abdominales et une diarrhée initialement aqueuse puis sanglante. Des complications pouvant mettre en jeu le pronostic vital des patients apparaissent dans environ 10% des cas, en moyenne une semaine après le début des symptômes digestifs. Elles se présentent sous forme de microangiopathies thrombotiques de deux types, (i) le SHU particulièrement chez l'enfant âgé de moins de 3 ans et les personnes âgées et (ii) le PTT chez l'adulte.





EHEC : *E. coli* entérohémorragique ; **SHU** : syndrome hémolytique et urémique ; **PTT** : purpura thrombotique thrombocytopénique

2.2.3.1. SHU

Chez les enfants âgés de moins de 15 ans, la colite hémorragique peut évoluer dans 2 à 10% des cas vers un SHU (Smith et *al.*, 2014 ; Espié et *al.*, 2008). Ce syndrome est caractérisé par une triade de symptômes associant une anémie hémolytique, une thrombopénie et une insuffisance rénale aiguë. Les lésions rénales les plus fréquentes sont une microangiopathie thrombotique glomérulaire caractérisée par un épaississement des parois capillaires glomérulaires et/ou des artérioles et la présence de micro-agrégats plaquettaires dans les

capillaires et les artérioles. Le traitement du SHU est symptomatique et fonction de la sévérité des symptômes (nutrition parentérale, transfusion, dialyse) (Keir, 2015).

2.2.3.2. PTT

Le PTT touche principalement l'adulte. Il est caractérisé par une anémie hémolytique microangiopathique, une thrombopénie, de la fièvre, des troubles neurologiques avec une insuffisance rénale aiguë. Des signes neurologiques sont observés dans 90% des cas d'évolution létale. Un traitement par exsanguinotransfusion ou plasmaphérèse associé à la perfusion de plasma frais congelé permet une évolution favorable dans plus de la moitié des cas (Smith et *al.*, 2014 ; Espié et *al.*, 2008).

2.2.4. Aspects épidémiologiques

Depuis la découverte des EHEC aux États-Unis au début des années 1980, de nombreuses épidémies et cas sporadiques ont été recensés au niveau mondi*al*. Parmi les pays industrialisés, les États-Unis, le Canada et le Royaume-Uni sont les plus concernés par ce type d'infection (Beutin 2006 ; Nataro et Kaper 1998 ; Rangel et *al.*, 2005) mais des cas ont aussi été recensés dans des pays en développement (Effler et *al.*, 2001). Il est à noter que les taux d'infection à EHEC peuvent être sous-estimés dans les pays manquant de capacités de diagnostic (Tarr et *al.*, 2005).

Chaque pays possède un système de surveillance qui lui est propre et les méthodes de détection utilisées sont variables. En France, les infections à EHEC ne figurent pas sur la liste des maladies à déclaration obligatoire. En l'absence de recherche systématique de ces bactéries en routine par les laboratoires d'analyses biologiques et médicales, la surveillance de ces infections repose sur la détection du SHU post-diarrhéique chez l'enfant âgé de moins de 15 ans par un réseau de néphrologues pédiatres. Depuis 2002, la surveillance par le Centre National de Référence des *E. coli* et *Shigella* permet de suivre l'évolution des tendances spatio-temporelles du SHU chez l'enfant, de déterminer les caractéristiques cliniques, microbiologiques et épidémiologiques des malades et de détecter des cas groupés de SHU ou d'infections à EHEC (Espié et *al.*, 2008). Conjointement, des réseaux internationaux participent à l'harmonisation des protocoles de détection et de déclaration (Beutin 2006).

2.2.4.1. Épidémies dans le monde

Les épidémies à EHEC sont d'importance variable, elles peuvent se présenter sous la forme de petites épidémies de moins d'une dizaine de cas ou d'épidémies de plus grande ampleur avec plusieurs centaines, voire plusieurs milliers de cas (TABLEAU 8) (Majowicz et al., 2014). D'une manière générale, les EHEC constituent la cause majeure des diarrhées hémorragiques et des SHU dans les pays à climat tempéré. Le continent Nord-Américain est le plus touché : entre 1982 et 2002, 350 épidémies ont été recensées avec 8600 cas, 4% de SHU et 0,5% de décès (Mariani-Kurkdjian et Bingen 2012; Rangel et al., 2005). En 1996, le Japon a été le siège de la plus grande épidémie répertoriée à ce jour avec 9451 cas, 1808 hospitalisations, 101 SHU et 12 décès. D'autres épidémies de plus faible ampleur ont également été décrites en Asie et Pacifique Sud (Thaïlande, Malaisie, Corée, Chine et Australie), Amérique du Sud (Argentine) et en Afrique (Afrique du Sud) (Reilly 1998). En Europe, des épidémies pouvant atteindre des centaines de cas d'infection à EHEC ont été signalées au Royaume-Uni entre 1992 et 2002 (Gillespie et al., 2005). En 2011, le bilan d'une épidémie due à une souche STEAEC en Europe, fait état de 3816 cas, 845 SHU et 54 décès répartis dans 15 pays, l'essentiel des cas se situant en Allemagne (EFSA, 2013). Ainsi, un total de 9485 infections confirmées à STEC a été signalé en 2011 dans l'Union Européenne, soit une augmentation d'un facteur 2,6 par rapport à 2010, essentiellement due à l'épidémie allemande (EFSA, 2013).

Bien que le nombre de cas détectés d'infections à EHEC ait augmenté avec le temps, reflétant peut-être de meilleures techniques de détection, le diagnostic de SHU chez les enfants est resté stable au cours des vingt dernières années dans les pays industrialisés, et la mortalité associée a diminué. Cependant, des fluctuations de l'incidence du SHU peuvent se produire lors des épidémies localisées.

2.2.4.2. Épidémies en France

En France, le système de surveillance a permis de détecter plusieurs épidémies d'infections à EHEC avec une source alimentaire commune identifiée. Deux épidémies majeures ont été recensées en 2005 : la première (69 cas dont 17 SHU) dans les régions Aquitaine et Midi- Pyrénées était liée à la consommation de steaks hachés surgelés, la seconde (17 cas de SHU) en Normandie était liée à la consommation de fromages au lait cru – type pâte molle à croûte fleurie – (Espié et *al.*, 2006). En 2011, deux épidémies sont survenues : la première (19 cas de SHU) dans le grand quart nord-est du pays, liée à la consommation

TABLEAU 8. Liste non exhaustive des principales épidémies à Escherichia coliproducteurs de Shiga-toxines survenus dans le monde depuis 2005(Modifié d'après Brugère et al., 2012)

SÉROGROUPE/SÉROTYPE	PAYS (ANNÉE)	MODE DE TRANSMISSION (ORIGINE)	NOMBRE DE CAS
O157:H7	États-Unis (2014)	Alimentaire (viande bovine)	12
0121	États-Unis (2014)	Alimentaire (graines germées)	19
O157:H7	États-Unis (2013)	Alimentaire (Salade verte)	33
0121	États-Unis (2013)	Alimentaire (produits surgelés)	35
O157	France (2013)	Alimentaire (fromage au lait cru)	8
O157:H7	France (2012)	Alimentaire (viande bovine)	4
0111	France (2012)	Transmission interhumaine (crèche)	4
O157	Japon (2012)	Alimentaire (cornichons)	94
O157:H7	États-Unis (2012)	Alimentaire (graines germées)	29
O104:H4	France (2011)	Alimentaire (graines germées)	24
O104:H4	Allemagne (2011)	Alimentaire (graines germées)	3816
O145:H28	Norvège (2009)	Transmission interhumaine (crèche)	16
O157	Angleterre (2009)	Contact avec des animaux de ferme	36
0157:Н-	Pays-Bas (2008-2009)	Alimentaire (viande bovine)	20
O157	États-Unis (2008)	Alimentaire (viande de bœuf)	99
0111	États-Unis (2008)	Alimentaire (non précisé)	341
O157:H-	États-Unis (2008)	Alimentaire (lait cru)	14
0157:Н-	Pays-Bas ; Islande (2007)	Alimentaire (salade verte)	50
O26:H11	Danemark (2007)	Alimentaire (viande bovine)	20
O26 ; 0145	Belgique (2007)	Alimentaire (glace au lait pasteurisé)	12
O157	Angleterre (2007)	Alimentaire (viande aviaire)	12
O157:H7	États-Unis (2006)	Alimentaire (salade verte)	77
O157:H7	Japon (2006)	Contact avec des animaux de ferme	4
O157:H7	États-Unis (2006)	Alimentaire (épinards)	205
O103	Japon (2006)	Transmission interhumaine (crèche)	8
O103:H25	Norvège (2006)	Alimentaire (viande ovine)	17
O26:H11	Japon (2006)	Transmission interhumaine (crèche)	6
O157:H7	France (2005)	Alimentaire (viande bovine)	69
O26:H11	France (2005)	Alimentaire (fromage au lait cru)	17

de steaks hachés et hamburgers surgelés, la seconde (12 cas de diarrhée, 5 cas de diarrhée sanglante et 7 SHU) dans la région de Bègles (Aquitaine) liée à la consommation de graines germées de fenugrec ou résultant d'une transmission interhumaine (cas secondaires) dans l'entourage d'un individu ayant consommé des graines germées contaminées. Une enquête européenne de traçabilité sur l'origine des graines de fenugrec incriminées a permis d'identifier un producteur et un lot de graines commun entre les épidémies aquitaine et allemande (King et *al.*, 2012). Deux épidémies à EHEC ont été identifiées en 2012 : une épidémie (4 cas de SHU) en Aquitaine, liée à la consommation de steaks hachés de bœuf et une épidémie (4 cas de SHU) dans une crèche bretonne due à une transmission interhumaine (King et *al.*, 2013). Enfin, une épidémie à EHEC O157 a été identifiée en Normandie en mai 2013 (8 cas dont 5 SHU) en lien probable avec la consommation de fromages au lait cru (King et *al.*, 2014).

2.2.4.3. Données épidémiologiques du SHU pédiatrique en France

En 2014, 117 cas de SHU et un décès suite à un SHU, ont été notifiés par le réseau de surveillance français. Au total, 84% des patients parmi les 117 cas testés présentaient une infection confirmée à EHEC (King et *al.*, 2014). L'incidence annuelle en 2014 du SHU est de 0,99/100 000 enfants de moins de 15 ans. Les incidences annuelles moyennes départementales du SHU pour 100 000 enfants de moins de 15 ans pour les périodes 1996-2014 sont présentées dans le **TABLEAU 9**.

Année	Nombre de cas de SHU	INCIDENCE ANNUELLE	Année	Nombre de cas de SHU	INCIDENCE ANNUELLE
1996	81	0,66	2006	104	0,87
1997	92	0,75	2007	74	0,62
1998	76	0,59	2008	112	0,94
1999	93	0,76	2009	109	0,91
2000	79	0,64	2010	122	0,99
2001	74	0,61	2011	162	1,32
2002	73	0,60	2012	145	1,20
2003	80	0,66	2013	152	1,22
2004	87	0,72	2014	117	0,99
2005	112	1,01	TOTAL	1954	

TABLEAU9. Incidence annuelle de SHU par 100000 enfantsde moins de 15 ans, France, 1996-2014 (D'après King et al., 2015)



FIGURE 29. Distribution géographique de cas de SHU en France chez l'enfant de moins de 15 ans (D'après King et *al.*, 2008 ; 2014 ; 2015)

Incidence moyenne du SHU par 100000 enfants au niveau départemental de (A) 1996 – 2007 ; (B) 1996 – 2013 et (C) au niveau régional en 2014. Depuis 1996, l'incidence annuelle moyenne la plus élevée a été observée dans les régions de Franche-Comté, Bretagne et Auvergne.





Les incidences annuelles moyennes régionales du SHU par 100 000 enfants de moins de 15 ans en 2014 et départementales pour les périodes 1996-2007 et 1996-2013 sont présentées en **FIGURE 29**. Depuis 1996, les incidences annuelles moyennes les plus élevées ont été observées dans les régions de Franche-Comté (1,7/100 000) et Bretagne (1,4/100 000), et au niveau départemental dans le Finistère (2,4/100 000), la Manche (2,1/100 000), le Doubs (2,1/100 000) et le Puy de Dôme (incidence > 1,5/100 000).

Par ailleurs, une recrudescence estivale du nombre de cas est observée avec 43% des cas survenant entre juillet et septembre (**FIGURE 30**). Le pic saisonnier habituel a été observé en 2014, moins marqué cependant qu'en 2013. Cette augmentation estivale est également observée dans d'autres pays européens et serait liée à une augmentation de l'excrétion fécale des STEC chez les animaux porteurs (Mariani-Kurkdjian et Bingen 2012). En 2014, 66% des enfants atteints de SHU étaient âgés de 3 ans et moins (âge médian de 29 mois – 2 mois à 14 ans –) et 62% des cas notifiés étaient des filles. Depuis le début de la surveillance en 1996, l'incidence la plus élevée est observée chez les enfants de moins de 3 ans : 2,9/100000 (Bruyand et *al.*, 2015). La proportion de cas d'infections intestinales à EHEC qui évoluent vers un SHU va de 3 à 9% dans les cas sporadiques (contre 20% dans certaines épidémies) mais les STEC ne sont pas recherchés de façon systématique chez les patients atteints de diarrhées. Des facteurs de sensibilité individuelle de l'hôte semblent jouer un rôle déterminant dans le déclenchement de la maladie.

2.2.4.4. Prévalence et classifications des STEC2.2.4.4.1. Sérotypes les plus fréquents

L'analyse des données épidémiologiques mondiales montre que plus de 400 sérotypes O:H distincts d'*E. coli* peuvent comprendre des souches productrices de Shiga-toxines. Toutes ne sont pas pathogènes pour l'Homme mais certaines sont associées à l'apparition de colites hémorragiques et de SHU. À titre d'exemple, une étude réalisée à Clermont-Ferrand a permis de mettre en évidence une prévalence de 2,5% de STEC chez 394 enfants hospitalisés – motif variable selon l'étiologie – ne présentant pas de diarrhée (Pradel et *al.*, 2000). La recherche systématique des EHEC dans les selles et/ou l'écouvillonnage rectal chez les patients atteints de SHU a permis d'améliorer les connaissances sur les sérogroupes d'EHEC en France. Le sérotype O157 est le plus fréquemment retrouvé avec 41,1 % des cas européens et 33 % des cas français en 2011 (EFSA 2013 ; King et *al.*, 2013). Mise à part le sérotype O157:H7, seul un

nombre restreint d'autres sérotypes a été associé à des épidémies, i.e. O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 et leurs dérivés non mobiles (**TABLEAU 10**). Les souches de ces cinq sérotypes sont les plus souvent associées à des signes cliniques graves (SHU) et aux épidémies et ont été définis comme des souches « EHEC typiques majeures ». Ces dernières ont la possibilité de provoquer des lésions d'attachement et d'effacement (A/E) des entérocytes (décrites dans le paragraphe 2.3.3.1). Parallèlement, des cas d'infections à EHEC « atypiques » existent, comme celles provoquées par des souches des sérogroupes O91, plutôt retrouvé chez l'adulte, et O104 ne produisant pas de lésions A/E (Guillard et *al.* 2015 ; Brugère et *al.* 2012 ; Beutin et *al.* 2007). En France, les infections à EHEC confirmées en 2013 étaient positives dans 43% des cas pour O157, 19% pour O26, 9% pour O80, 6% pour O121, 6% pour O111, 5% pour O145 et 2% étaient non-sérotypables (King et *al.*, 2014).

TABLEAU10.**Classification**dessérotypesdeSTECenséropathotypes(D'après Brugère et al., 2012)

Séropathotype	INCIDENCE RELATIVE	IMPLICATION DANS DES ÉPIDÉMIES	Association avec les SHU ou les colites hémorragiques	Sérotypes
А	Élevée	Fréquente	Oui	O157:H7, O157:NM
В	Modérée	Non fréquente	Oui	O26:H11, O103:H2, O111:H8, O111:NM, O121:H19, O145:NM
С	Faible	Rare	Oui	O91:H21, O104:H21, O113:H21 et autres sérotypes
D	Faible	Rare	Non	Multiples sérotypes
Е	Absente chez l'Homme	Non applicable	Non applicable	Multiples sérotypes

NM : non mobile

2.2.4.4.2. Classification des STEC en séropathotypes

Une classification des STEC en cinq séropathotypes (de A à E; **TABLEAU 11**) a été proposée par Karmali et collaborateurs (2003). Cette classification est basée sur (i) l'incidence relative des sérotypes dans les infections humaines, (ii) leur fréquence d'implication dans des épidémies et (iii) leur association ou non avec des symptômes cliniques sévères. Les séropathotypes A et B incluent les souches associées aux épidémies avec SHU, le séropathotype A regroupant les souches de sérotype O157:H7. Le séropathotype C comprend les souches associées aux cas sporadiques de SHU. Le séropathotype D regroupe les souches ayant une faible incidence sur l'Homme et non associées à des SHU ou des colites hémorragiques. Enfin, les souches du séropathotype E ne sont pas retrouvées chez l'Homme et sont considérées comme non pathogènes.

2.3. Facteurs de virulence et pouvoir pathogène

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la physiopathologie des infections humaines dues aux EHEC, il est important de bien connaitre les différents facteurs de virulence décrits à ce jour chez ces bactéries. La virulence des EHEC est associée à deux processus : la production de Shiga-toxines et la colonisation du tube digestif des patients (Ho et *al.*, 2013 ; Mariani-Kurkdjian et Bonacorsi 2014).

2.3.1. Shiga-toxines

2.3.1.1. Structure

La virulence des EHEC est principalement associée à la production et la libération de Shiga-toxines (encore appelées vérotoxines). Ces exotoxines ont un effet cytopathogène sur certaines lignées cellulaires (cellules Vero, HeLa, KB) et présentent des homologies de séquence en acides aminés avec la toxine de Shiga produite par *Shigella dysenteriae* type 1. Deux types de Shiga-toxines (Stx) ont été identifiés : Stx1 et Stx2, présentant respectivement 99% et 56% d'homologie avec la toxine de *Shigella*. Les Shiga-toxines sont des hétéropolymères de 70,5 kDa constitués d'une sous-unité enzymatique A de 32 kDa et de 5 sous-unités B de 7,7 kDa, chacune permettant la liaison des toxines au récepteur cellulaire globotriosyl céramide 3 ou Gb3 (galactose- α (1-4), galactose- β (1-4) glucose céramide). Les données cristallographiques montrent que les sous-unité s forment un anneau pentamérique dans lequel s'insère l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité A (Johannes et Römer 2010). Une représentation en ruban de la structure cristalline des Stx est présentée dans la **FIGURE 31**.



FIGURE 31. Représentation en ruban de la structure cristalline des Shiga-toxines (D'après Odumosu et *al.*, 2010)

La sous-unité A, StxA (en bleu), est composée de deux fragments peptidiques liés de manière covalente par une liaison disulfure : A1 (28 kDa) et A2 (4 kDa). Le clivage de ces deux fragments en Cys242-Cys261 dans l'appareil de Golgi est requis pour l'activation du fragment A1. Les sous-unités de StxB (7,7 kDa) s'associent pour former un homopentamère.



FIGURE 32. Régulation de l'expression des gènes stx (D'après Waldor et Friedman, 2005)

(a) La répression lysogénique : la réplication du phage est réprimée par le répresseur cI fixé sur les opérateurs O_L et O_R présents sur les promoteurs des gènes précoces du phage P_L et P_R . En absence de RecA, cI initie la transcription depuis P_{RM} et synthétise le répresseur pour maintenir le cycle lysogénique. En absence de Q, la transcription initiée au promoteur $P_{R'}$ se termine immédiatement en aval du terminateur. Le signal \checkmark indique l'action d'agents qui provoquent la réponse SOS conduisant à l'augmentation de production et d'activation de RecA qui facilite l'auto clivage de cI et lève la répression. (b) L'induction lytique : la cascade de régulation commence par l'initiation de la transcription aux promoteurs P_L et P_R qui se termine après a synthèse d'un message court permettant l'expression de N, qui agit aux sites NUT de l'ARN. Ensuite Q s'exprime et agit sur le site *qut* de l'ADN permettant ainsi de modifier l'initiation de la transcription au $P_{R'}$ en une forme résistante à la terminaison. Ceci permet la transcription de l'ADN permettant ainsi de modifier l'initiation de la transcription au $P_{R'}$ en une forme résistante à la terminaison. Ceci permet la transcription des gènes en aval comme les gènes *stx* et *lys* et aussi la plupart des gènes requis pour la production du phage viable.

2.3.1.2. Variants

Des variants des toxines Stx1 et Stx2 ont été identifiés. Ils diffèrent par des substitutions d'acides aminés dans leurs sous-unités A et B, influençant la toxicité et la spécificité des toxines vis-à-vis du récepteur Gb3 (Prager et al., 2011). D'après la nomenclature standardisée des variants Stx proposée par Scheutz et al. (2012), les groupes Stx1 et Stx2 sont constitués respectivement de trois (Stx1a, Stx1c et Stx1d) et sept (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f et Stx2g) sous-types. Bien que les toxines des groupes Stx1 et Stx2 se distinguent par leurs propriétés immunologiques, leur mécanisme d'action et leurs propriétés biochimiques sont similaires. Cependant, l'issue clinique des infections à EHEC dépend, en grande partie, du génotype stx de la souche infectante, Stx2 étant la plus souvent associée aux cas pathologiques les plus sévères (Boerlin et al., 1999 ; Siegler et al., 2003). De plus, la présence des sous-types *stx2a* ou *stx2c* est associée aux pathologies les plus sévères comme la colite hémorragique et le SHU, tandis que stx2e et stx2f sont associés aux diarrhées et au portage asymptomatique (Friedrich et al., 2002 ; Orth et al., 2007). Par ailleurs, l'analyse phylogénétique associée au génotypage *stx* de la souche semble être hautement prédictif de la pathogénicité. En effet, les différents variants Stx ne sont pas isolés avec la même fréquence lors des d'infections par les EHEC. À titre d'exemple, le variant Stx1 n'est pas présent seul chez les souches de séropathotype A, le plus virulent. Il est en revanche présent, seul ou avec Stx2, chez les souches appartenant aux autres séropathotypes, en particulier chez les sérotypes qui ne sont pas retrouvés lors d'infections ou associés aux cas les moins sévères d'infection (Girardeau et al., 2005).

Les mécanismes de régulation de l'expression de ces toxines sont encore mal compris. Le prophage est maintenu en phase lysogénique par le répresseur cI produit par l'expression constitutive des gènes présents sur le phage lui-même. Ce répresseur se fixe sur des opérateurs présents sur les promoteurs des gènes précoces du phage, pL et pR. Les gènes *stx* sont situés en aval d'un autre promoteur tardif du phage, pR'. Un terminateur de transcription assure l'inefficacité de ce promoteur lors de la lysogénie. En revanche, lorsque le phage est induit, le répresseur cI est clivé, l'expression des gènes précoces (de réplication du phage notamment) est rendue possible. Parmi ces gènes précoces se trouve aussi le gène codant pour l'antiterminateur Q qui permet la transcription des gènes tardifs du phage, dont les gènes *stx* et les gènes de lyse, à partir du promoteur pR' (**FIGURE 32**).
Les phages portant les gènes *stx* sont inductibles, comme tous les phages de type λ , par un système bactérien de réponse au stress : le système SOS. Tous les agents responsables de dommages à l'ADN comme les rayons UV ou certains antibiotiques tels que les quinolones, le triméthoprime ou la mitomycine C sont capables de déclencher la réponse SOS bactérienne, le cycle lytique des phages et par conséquent la production de Stx (Wagner et Waldor, 2002).

2.3.1.3. Passage des Shiga-toxines au niveau de l'épithélium intestinal

Les complications systémiques observées au cours des infections à EHEC résultent d'une liaison entre les Stx et les récepteurs Gb3 situés sur les cellules endothéliales rénales et cérébrales. Il est admis que les Shiga-toxines atteignent les cellules cibles via la circulation sanguine (Karmali et *al.*, 1985). Des Stx libres ont été détectées en quantité négligeable dans le sérum des patients atteints de SHU mais sont présents en quantité élevée à la surface des leucocytes polynucléaires (Brigotti et *al.*, 2011). Une fois libérées dans la lumière intestinale, les Stx doivent traverser l'épithélium intestinal, qui lorsqu'il est sain, n'exprime pas le récepteur Gb3 ou tout autre récepteur aux Stx sauf dans les cellules de Paneth localisées à la base de cryptes de Lieberkühn dans l'intestin grêle (Schüller et *al.*, 2007). En revanche, l'expression de Gb3 sur l'épithélium colique humain est associée à une malignité et/ou à la présence de métastases (Schüller, 2011). Le mécanisme de la translocation des Stx est incertain, les modèles animaux disponibles étant inappropriés pour étudier cet aspect de la physiopathologie des infections à EHEC. En effet, le récepteur Gb3 est présent dans le côlon distal des souris et, chez le lapin l'expression intestinale de Gb3 augmente rapidement avec l'âge (Schüller, 2011).

Différentes voies possibles de translocation des Stx ont été proposées, i.e. Stx1 pourrait utiliser un mécanisme de transcytose Gb3-indépendant, alors que la transmigration des neutrophiles à travers l'épithélium intestinal permettrait le passage des toxines Stx2 par voie paracellulaire (Hurley et *al.*, 2001 ; Yamasaki et *al.*, 1999). Par ailleurs, (Phillips et al. 2000b) ont montré, à l'aide de culture *in vitro* de biopsies intestinales humaines, que les EHEC adhèrent principalement à l'épithélium du follicule associé aux plaques de Peyer de l'intestin grêle. Cette zone est particulièrement riche en cellules M spécialisées dans la translocation des antigènes du microbiote intestinal luminal aux cellules présentatrices d'antigènes sous-jacentes. En raison de leur activité de transcytose, les cellules M sont souvent exploitées par des agents pathogènes intestinaux et ont également été impliquées dans la translocation de toxines bactériennes, comme par exemple l'entérotoxine A staphylococcique (Maresca et *al.*, 2007) mais aussi de la Shiga-toxine (Schüller 2011). En effet, Etienne-Mesmin et *al*. (2011) ont montré que les EHEC sont capables de transloquer à travers les cellules M et de survivre et produire des Stx dans les macrophages avant d'induire leur apoptose et provoquer un relarguage des toxines dans la *lamina propria* (**FIGURE 33**).



FIGURE 33. Nouveau modèle d'infection par les EHEC (Modifié d'après Etienne- Mesmin et *al.*, 2011)

Le devenir des EHEC et de leurs toxines dans les cellules épithéliales de l'intestin est schématisé. Les Shiga-toxines produites dans la lumière intestinale peuvent traverser l'épithélium intestinal humain par macropinocytose et par voie paracellulaire. Parallèlement, les EHEC traversent la barrière intestinale via les cellules M. Dans la lamina propria, les EHEC pénètrent, survivent et produisent des Shiga-toxines dans les macrophages résidents et induisent leur mort cellulaire. Les Shiga-toxines libérées pourraient ensuite rejoindre la circulation sanguine et atteindre les organes cibles impliqués dans la physiopathologie des infections à EHEC

EHEC : *E. coli* entérohémorragique ; **L.B** : Lymphocytes B ; **L.T** : Lymphocytes T ; **Stx** : Shiga-toxine

Par ailleurs, l'infection de cellules épithéliales intestinales par des souches d'EHEC stimule la macropinocytose des Stx (Lukyanenko et *al.*, 2011). Ce mécanisme est indépendant des lésions A/E et la sécrétion de sérines protéases solubles, comme EspP (« *E. coli*-secreted protein P »), serait suffisante pour induire un remodelage de l'actine cellulaire et stimuler la macropinocytose et la transcytose transcellulaire des Stx (In et *al.*, 2013). Parallèlement, il a été montré que l'environnement microaérobie de l'intestin humain favorise la macropinocytose de Stx2 à travers l'épithélium intestinal humain *in vitro* avec des teneurs en oxygène comprises entre 1,4 et 1,7% (Tran et *al.*, 2014).

Les diarrhées induites par les EHEC s'accompagnent d'une inflammation de la muqueuse et de dommages dans le cæcum et le côlon ascendant (Shigeno et *al.*, 2002). Par conséquent, il est possible que les Shiga-toxines traversent l'épithélium endommagé à un stade ultérieur de l'infection (Schüller 2011).

2.3.1.4. Mécanisme d'action des Shiga-toxines au niveau des cellules cibles

La première étape du devenir des Stx dans les cellules cibles est la fixation des toxines à la membrane cytoplasmique des cellules endothéliales intestinales, rénales et cérébrales exprimant le récepteur glycolipidique, le globotriosyl céramide Gb3. C'est le digalactoside terminal, le motif galactose- α (1-4) de ce glycolipide qui est spécifiquement reconnu par les sous-unités StxB. La toxine est alors internalisée par endocytose, avec formation d'une vacuole de clathrine contenant le complexe toxine/Gb3, puis subit un transport rétrograde à travers l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique. La sous-unité A, porteuse de l'activité enzymatique, est constituée du fragment A1 contenant le site enzymatique et du fragment A2 lié par son extrémité carboxy-terminale à trois des cinq sous-unités B (Odumosu et al., 2010). Une réduction du pont disulfure reliant ces fragments permet la libération de la sous-unité A1 dans le cytosol. Celle-ci possède une activité N-glycosidase sur l'adénosine 2348 de l'ARN ribosomique 28S, bloquant ainsi la sous-unité 60S du ribosome. La sous-unité 60S du ribosome n'est alors plus capable d'interagir avec les facteurs d'élongation EF1 et EF2, ce qui entraine un arrêt de la synthèse protéique. L'activation séquentielle de caspases (caspases 3, 8 et 9) induit la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN conduisant à la mort cellulaire par apoptose (Johannes et Römer, 2010) (FIGURE 34).



FIGURE 34. Mécanisme d'action des Shiga-toxines (Modifié d'après le bilan des connaissances relatives aux STEC, AFSSA, 2003)

(1) Après fixation des toxines Stx sur le récepteur Gb3 présent à la surface des cellules endothéliales (reins, cerveau, intestins), on observe : (2) l'internalisation de la toxine dans une vacuole d'endocytose, (3) son transport rétrograde de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique, (4) la scission de la sous-unité A en 2 parties A1 et A2 (réduction d'un pont disulfure) dans le réticulum endoplasmique et (4) la translocation de A1 dans le cytoplasme. L'activité N-glycosidase d'A1 s'exerce sur l'ARN28S et entraîne une inhibition totale des synthèses protéiques et la mort de la cellule par apoptose (5).

Gb3 : globotriosyl 3 céramide ; $stx\;A$: gène codant la sous-unité A ; $stx\;B$: gène codant la sous-unité B

2.3.2. Résistance à l'acidité

Une des propriétés communes aux agents bactériens pathogènes associés aux voies de transmission alimentaire et oro-fécale est la capacité à survivre dans un environnement acide. En effet, des acides faibles peuvent être apportés au cours de la fabrication ou de la transformation de l'aliment et/ou produits par sa fermentation. Par conséquent, la résistance à l'acidité peut permettre aux microorganismes pathogènes de survivre dans les aliments jusqu'à leur consommation. Une fois ingéré, l'agent pathogène est confronté à différents types d'exposition acide dans le tractus gastro-intestinal : les sécrétions gastriques acides, considérées comme une barrière bactéricide et les AGCC produits par le microbiote intestin*al*. Les bactéries entériques ont acquis une vaste gamme de systèmes de réponse au stress acide afin de résister aux environnements acides rencontrés. Ainsi, la dose infectieuse moyenne des différents agents pathogènes entériques reflète leur aptitude relative à résister à cet environnement acide, e.g. 10⁹ et 10² cellules respectivement pour *Vibrio cholerae* et *Shigella flexneri*. Les EHEC auraient des doses infectieuses similaires à celles de *Shigella* spp. (Lin et al. 1996a).

Cinq systèmes de résistance à l'acidité (AR1 à AR5) ont été mis en évidence chez E. coli (FIGURE 35). Les trois principales voies de résistance à l'acidité sont AR2, AR3 et AR4. Les voies AR2 et AR3 permettent aux bactéries de survivre dans des environnements extrêmement acides, i.e. pH 2,5. Les voies du AR4 et AR5 permettent aux E. coli de survivre dans des environnements modérément acides i.e. pH 4,5 (Hong et al., 2012; Zhao et Houry 2010). Le système oxydatif AR1 est encore assez mal connu. Il peut être activé chez des bactéries cultivées dans un milieu minimum à pH 2,5 dépourvu d'acides aminés, après une préculture dans un bouillon Luria Bertani à pH 5,5. Ce système est dépendant d'une sous-unité de l'ARN polymérase bactérienne (le facteur σ^{S}) et de la protéine récepteur du cAMP (adenosine monophosphate cyclique) et est réprimé par le glucose. Les voies AR2 à AR5 sont respectivement basées sur la décarboxylation du glutamate, de l'arginine, de la lysine et de l'ornithine. Toutes ces réactions de décarboxylation consomment un proton et libèrent du dioxyde de carbone. De plus, les E. coli présentent dans leur génome les gènes hdeA et hdeB codant respectivement les protéines chaperonnes HdeA et HdeB. Ces protéines périplasmiques confèrent une protection indispensable vis-à-vis des dommages provoqués par un environnement acide (pH < 3) compte tenu de la perméabilité de la membrane externe bactérienne (Carter et al., 2012).



FIGURE 35. Systèmes de résistance à l'acidité chez *E. coli* (Modifié d'après Zhao et Houry, 2010)

Le système AR1, peu caractérisé, n'apparaît pas dans ce schéma. Les réactions de décarboxylation des acides aminés consomment un proton et libèrent du dioxyde de carbone. Les acides aminés et les produits de décarboxylation correspondants sont représentés sous leur formule chimique. Les protéines responsables de la réaction sont indiquées sous les flèches réactionnelles.

AR2 : système de décarboxylation du glutamate ; **AR3** : système de décarboxylation de l'arginine ; **AR4** : système de décarboxylation de la lysine ; **AR5** : système de décarboxylation de l'ornithine ; **Arg** : arginine ; **CI**⁻ : ion chlorure ; **CO**₂ : dioxyde de carbone ; **Glu** : glutamate ; **H**⁺ : ion hydrogène ; **HdeA/B** et **HsP31** : protéines chaperonnes ; **Lys** : lysine ; **Orn** : ornithine

2.3.3. Facteurs d'adhésion

L'unique production de Shiga-toxines, sans facteur d'adhésion, est jugée insuffisante pour induire l'ensemble des aspects de la physiopathologie des infections à EHEC. La plupart des souches EHEC ont la possibilité de provoquer des lésions d'attachement et d'effacement (A/E) des entérocytes de l'iléon distal et du côlon (Yuwen Chong et al. 2007; Shigeno et al. 2002; Lewis et al. 2015), cependant ces dernières (« EHEC typiques ») sont à différencier des EHEC « atypiques » ne produisant pas des lésions A/E mais possédant d'autres mécanismes d'adhésion à la muqueuse colique.



(C) Représentation schématique du système de sécrétion de type III

FIGURE 36. Lésions d'attachement et d'effacement chez les EHEC

(A) Observation au microscope électronique à transmission des lésions d'attachement et d'effacement chez les EPEC/EHEC. La flèche indique le piédestal, constitué d'actine cellulaire, résultant d'une désorganisation du cytosquelette de l'entérocyte aboutissant à la destruction locale des microvillosités intestinales (D'après Wong et *al.*, 2011). (B) Le LEE, organisé en cinq opérons majeurs, contient des gènes codant une protéine de membrane externe (l'intimine) et son récepteur cellulaire spécifique (Tir ou Translocated intimin receptor), un système de sécrétion de type III impliqué dans la translocation des effecteurs dans la cellule hôte et des protéines sécrétées Esp (D'après Stevens et Frankel 2014). (C) Représentation schématique du système de sécrétion de type III des EHEC (D'après Stevens et Frankel 2014). (D) Observation au microscope électronique à transmission d'une seringue moléculaire (désignée par la flèche blanche) (D'après Garmendia et *al.*, 2005).

ADP : adénosine diphosphate ; **ATP** : adénosine triphosphate ; **CesT** : Chaperone of *E. coli* secretion T ; **Esc** : *E. coli*-secreted component ; **Esp** : *E. coli*-secreted protein ; **Map** : Mitochondrial-associated protein ; **Sep** : Secretion of *E. coli* proteins ; **Tir** : Translocated intimin receptor

2.3.3.1. Lésion d'attachement-effacement

Les lésions A/E induites par les « EHEC typiques » sont semblables à celles provoquées par les EPEC (**FIGURE 36A**). Le mécanisme global de l'apparition des lésions A/E résulte de l'action combinée de protéines codées par des gènes localisés sur un îlot de pathogénicité de 43395 pb, le locus d'effacement des entérocytes (LEE) (**FIGURE 36B**) et peut être décomposé en trois étapes : (i) une adhésion des bactéries à la surface des microvillosités intestinales, (ii) une injection dans le cytoplasme des entérocytes, via un système de sécrétion de type III (**FIGURE 36C**), d'effecteurs provoquant une dépolymérisation de l'actine cellulaire en regard de la zone d'adhésion et (iii) une désorganisation du cytosquelette de l'entérocyte aboutissant à la destruction locale des microvillosités intestinales (Stevens et Frankel 2014). Un piédestal constitué d'actine cellulaire sur lequel les bactéries peuvent s'enchâsser de façon étroite est alors constitué (Frankel et *al.*, 1998 ; Wong et *al.*, 2011).

Le LEE, organisé en cinq opérons majeurs (**FIGURE 36B**), contient des gènes codant une protéine de membrane externe (l'intimine) et son récepteur cellulaire spécifique (Tir ou Translocated intimin receptor), un système de sécrétion de type III impliqué dans la translocation des effecteurs dans la cellule hôte (**FIGURE 36C**) et des protéines sécrétées (Esp ou *E. coli*-secreted protein) (Croxen et *al.*, 2013 ; Garmendia, et *al.*, 2005 ; Puhar et Sansonetti 2014 ; Wong et *al.*, 2011). De plus, il a été montré dans un modèle murin que les lésions A/E sont essentielles pour induire la sécrétion d'IgA (Immuno-globuline A) dirigé contre *E. coli* O157:H7, contrairement à celle d'IgM et d'IgG (Nagano et *al.*, 2014).

2.3.3.2. Long Polar Fimbriae

Le séquençage génomique de souches « typiques » EHEC O157:H7 indique qu'au moins quatorze loci codent des adhésines putatives. Deux de ces régions contiennent des gènes étroitement liés à l'opéron *lpf* (« long polar fimbriae ») de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Bäumler et Heffron, 1995). L'analyse du génome de la souche O157:H7 EDL 933 a mis en évidence la présence des opérons *lpf1* et *lpf2*, respectivement dans les îlots de pathogénicité (O Islands, OI) OI141 et OI154. Les opérons *lpf* regroupent un ensemble de gènes : *lpf*ABCC'DE chez *lpf1*, qui est similaire à celui retrouvé chez *Salmonella* (Torres et *al.,* 2002), et *lpf*ABCDD' pour *lpf2*. Les protéines codées par ces gènes produisent les différentes unités des Lpf : la sous-unité fimbriale majeure (LpfA), une protéine chaperonne (LpfB), des

protéines d'ancrage à la membrane (LpfC et LpfC') et des sous-unités fimbriales mineures (LpfD, LpfD' et LpfE) (Bäumler et Heffron, 1995). Deux autres opérons *lpf* ont été décrits : l'opéron *lpf*₀₁₁₃ chez des souches de sérotypes O113:H21 et l'opéron *lpf*₀₂₆ chez des STEC de sérogroupes O26 (**FIGURE 37**) (Doughty et al. 2002b; Toma et al. 2004).



FIGURE 37. Organisation génétique des opérons *lpf* de la souche EHEC O157:H7 et O113:H21 (D'après Toma et *al.*, 2004)

L'analyse du génome de la souche EHEC O157:H7 de référence EDL933 a permis de mettre en évidence la présence de 2 opérons *lpf* localisés au niveau des îlots de pathogénicité OI-141 constitué de 6 gènes *lpf*ABCC'DE et OI-154 constitué de 5 gènes *lpf*ABCDD'. L'opéron *lpf* de la souche O113:H21 est constitué de 4 gènes *lpf*ABCD.

2.3.3.2.1. Distribution des variants *lpf*

La prévalence des gènes lpf1 et lpf2 est très élevée chez les souches STEC O157:H7 les plus virulentes associées à des épidémies (Szalo et *al.*, 2002 ; Toma et *al.*, 2006 ; Torres et *al.*, 2004). En analysant les séquences ADN de plusieurs souches STEC qui portent l'opéron LEE, différents variants *lpf* ont été décrits (Torres et *al.*, 2009) : cinq pour *lpf1* et trois pour *lpf2*. Cette étude montre qu'il y aurait des associations spécifiques entre les différents variants *lpf* et ceux du gène de l'intimine. De plus certaines combinaisons de variants *lpf* peuvent être associées à des sérotypes spécifiques c'est le cas de *lpfA1-3* et *lpfA2-2* uniquement retrouvés chez les souches O55:H7 et O157:H7 (Torres et *al.* 2009).

2.3.3.2.2. Régulation de l'expression des *lpf*

Différents facteurs environnementaux influencent l'expression des lpf: des études ont montré *in vitro* que chez O157:H7 l'expression des lpf varie en fonction des conditions de culture (telles que la température et le pH) et qu'elle était optimale à 37°C en phase de croissance exponentielle (Low et *al.*, 2006 ; Torres et *al.*, 2007). L'analyse du promoteur des lpf a permis d'identifier deux protéines impliquées dans la régulation de l'opéron lpfA1 d'*E. coli* O157:H7 : H-NS (histone-like nucleoid structure) qui inhibe la transcription de lpfA1 tandis que Ler (un gène activateur du LEE) pourrait inhiber l'action de la protéine HNS, induisant ainsi l'expression de lpf1 (Torres et *al.*, 2007 ; Torres et *al.*, 2008 ; Rojas-López et *al.*, 2011). Récemment, l'effet répresseur de la protéine H-NS sur l'expression des lpf a aussi été décrit chez les EPEC (Hu et al. 2015b). Concernant l'operon lpf2 les mécanismes de régulation sont peu connus ; cependant lorsque O157:H7 est cultivée en présence de sels biliaires, l'expression des lpf2 est augmentée et cette expression semble être médiée par le facteur de transcription Fur (Arenas-Hernández et *al.*, 2014). Cet effet des sels biliaires avaient déjà été décrit chez les AIEC où c'était le facteur de transcription FhIA qui était impliqué (Chassaing et *al.*, 2013).

2.3.3.2.3. Rôles des Lpf

Les Lpf, décrits pour la première fois en 1995, seraient impliqués dans le ciblage des plaques de Peyer par *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium et les AIEC (Bäumler et *al.*, 1996 ; Chassaing et *al.*, 2011).

Chez les EHEC, les études actuelles montrent des résultats contradictoires quant au rôle spécifique des Lpf. (Fitzhenry et al. 2006) ont montré qu'en modèle *in vitro* de culture d'intestin humain (IVOC), la délétion des gènes *lpf* pertubait le ropisme des EHEC : le mutant semblait adhérer à des niveaux plus élevés aussi bien au niveau du FAE mais aussi de la muqueuse intestinale, comparativement à la souche sauvage. D'autres études montrent que les Lpf semblent être impliqués dans l'adhésion du pathogène aux cellules épithéliales *in vitro* (Torres et *al.*, 2004 ; Torres et *al.*, 2002 ; Farfan et *al.*, 2011) ainsi que dans des modèles de culture

d'organes *in vitro* (Lloyd et *al.*, 2012). Farfan et *al.* (2011) suggèrent des interactions entre les Lpf et les protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène de type IV et laminine). Cependant, Lloyd et *al.*, (2012) ont montré en modèle de culture cellulaire T84, que le double mutant *lpf* adhère à des niveaux plus élevés comparativement à la souche sauvage. De même, chez les EPEC ou *Citrobacter rodentium*, les Lpf ne sont pas impliqués dans l'adhésion aux différentes cellules épithéliales Caco2, T84 et Hela (Newton et *al.*, 2004 ; Tatsuno et *al.*, 2006). D'autres études *in vivo* dans différents modèles animaux, tels que le cochon et le mouton, suggèrent un rôle des Lpf dans la colonisation intestinale et la persistance d'O157:H7, les mutants délétés des gènes *lpf* étant retrouvés à des niveaux plus faibles dans les fèces que la souche sauvage (Jordan et *al.*, 2004). Une étude *in vivo* chez le lapin a cependant montré que cette mutation ne modifiait pas la capacité de colonisation des ETEC (Newton et *al.*, 2004). Enfin, les Lpf participeraient à la réponse inflammatoire suite à une infection à EHEC en modèle de culture cellulaire T84, en induisant l'expression des gènes de cytokines et leur sécrétion (II-8 et CCL20) (Vergara et *al.*, 2014 ; Farfan et *al.*, 2013).

2.3.3.3. Autres facteurs d'adhésion

Des souches LEE-négatives ont été associées à des SHU. Ces souches EHEC « atypiques » possèdent d'autres facteurs d'adhésion permettant une colonisation de la muqueuse colique, comme par exemple l'adhésine Saa (STEC autoagglutinating adhesin) des souches O113:H21 isolées en Australie en 1998 ou les facteurs d'adhésion enteroaggrégants décrits chez *E. coli* O111:H2 en France en 1996 et chez *E. coli* O104:H4 responsable des épidémies allemande et française de 2011 (Mariani-Kurkdjian et Bingen, 2012).

Les curli, protéines présentes à la surface des bactéries, ont d'abord été décrits comme des facteurs permettant la formation de biofilm sur des surfaces abiotiques et une résistance des bactéries aux antiseptiques. Chez *E. coli*, deux opérons codent les gènes associés à ces facteurs : *csgDEFG* et *csgAB* (Hammar et *al.*, 1995). Chez les EHEC, il a été montré que les curli étaient impliqués dans l'interaction des bactéries avec des cellules épithéliales T84 et plus spécifiquement avec les protéines de la matrice extracellulaire (Olsén et *al.*, 1998).

D'autres adhésines potentielles ont également été mises en évidence, comme le facteur codé par le locus chromosomique *efa*-1, des pili de type IV, des médiateurs de l'adhérence sans

rôle évident dans la pathogénicité, i.e. les adhésines chromosomiques Iha (Vibrio cholerae IrgA homologue), Cah (calciumbinding antigen 43 homologue) et OmpA (outer membrane protein A) ou encore une protéine fimbriale mineure (YadK) sur-exprimée après un stress acide (Chingcuanco et *al.*, 2012 ; Cadona et *al.*, 2013 ; Barnett Foster, 2013). De plus, en ce qui concerne *efa*-1, une version tronquée, toxB existe sur le plasmide pO157 d'O157:H7. Bien que toxB soit utile dans le processus d'adhésion aux cellules épithéliales, la présence de ce gène influence indirectement l'adhésion en modulant la production et la sécrétion des effecteurs, codés par le LEE, requis pour la formation des lésions A/E (Torres et *al.*, 2005).

Ainsi de nombreux facteurs d'adhésion susceptibles de jouer un rôle dans la colonisation du tube digestif par les EHEC ont été décrits, mais leur implication dans la pathogénicité reste à démonter (FIGURE 38).



FIGURE 38. Rôle proposé des adhésines des EHEC (D'après McWilliams et Torres, 2014)

(A) Les Lpf interagiraient avec les protéines de la matrice extracellulaire telles que la laminine, le collagène IV et la fibronectine. (B) Une fois l'interaction initiale avec l'épithélium intestinal établie, les EHEC sont en mesure de se fixer étroitement à la cellule hôte. (C) Après interaction entre l'intimine et son récepteur Tir, l'injection de protéines effectrices entraîne le réarrangement de l'actine. (D) Des pili à la surface des EHEC intéragiraient avec l'épithélium intestinal de l'hôte renforçant la colonisation par la formation de microcolonies et/ou de biofilms. Il a été montré que les curli contribuaient à la formation de biofilm. (E) Lorsque l'expression des curli est dominante, il a été proposé que cette structure pouvait intéragir avec des surfaces abiotiques et de plantes mais aussi les protéines de la matrice extracellulaire.

Lpf : long polar fimbriae ; **ECM** : membrane extracellulaire ; **ECP** : *E. coli* common pilus ; **HCP** : hemorrhagic *E coli* pilus



FIGURE 39. Représentation simplifiée de la cartographie du génome *E. coli* O157:H7 EDL 933 et de ses plasmides

(A) Le cercle interne du génome représente l'échelle en nucléotides. Les îlots de pathogénicité sont matérialisés en rouge (D'après Perna et *al.*, 2001). (B) Le cercle extérieur de pO157 représente l'échelle en nucléotides. L'orientation de la transcription est dans le sens horaire pour les cadres de lecture extérieurs et dans le sens anti-horaire pour les cadres de lecture internes. Les opérons sont indiqués par des flèches. (D'après Burland et *al.*, 1998).

 \boldsymbol{bp} : paire de bases ; \boldsymbol{CAI} : Codon Adaptation Index

2.3.1. Autres facteurs de virulence

D'autres facteurs de virulence potentiels, codés par des gènes présents sur le chromosome et/ou sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages ou îlots de pathogénicité), ont été décrits chez les souches EHEC : l'entérohémolysine Ehx (gène plasmidique *ehxA*) responsable de la formation de pores dans la membrane cytoplasmique, l'entérohémolysine thermostable East-1 (gène chromosomique *astA*) jouant un rôle dans l'induction de la phase initiale de diarrhée aqueuse, la cytotoxine subtilase SubAB, la sérine protéase EspP (gène plasmidique *espP*) capable de cliver le facteur humain V de coagulation humain et contribuant au développement des colites hémorragiques, la catalase peroxydase périplasmique KatP (gène plasmidique *katP*), la métalloprotéase StcE (gène plasmidique stcE), des systèmes de captation du fer ou encore des uréases (Brugère et *al.*, 2012 ; Law, 2000 ; Gouali et Weill, 2013). La liste de ces facteurs de virulence potentiels ne cesse de s'allonger mais, à ce jour, leur rôle dans la pathogénie des EHEC n'est pas totalement démontré. Une représentation simplifiée de la cartographie du génome *E. coli* O157:H7 EDL 933 et de ses plasmides est présentée en **FIGURE 39**.

2.3.2. Régulation par les facteurs environnementaux du tractus digestif humain

Les agents pathogènes d'origine alimentaire, comme les EHEC, sont soumis à différents stress préalablement à leur ingestion puis dans le tractus digestif. Les contraintes les plus courantes lors de la transformation, le stockage et la préparation des aliments sont la température, la pression osmotique et l'acidité de la matrice alimentaire (Chung et *al.*, 2006 ; Smith et *al.*, 2013). Néanmoins, ces facteurs ne seront pas décrits dans ce manuscrit, seuls seront répertoriés les facteurs présents dans l'environnement digestif humain afin de comprendre comment ils peuvent jouer un rôle dans la régulation spatio-temporelle de la virulence des EHEC lors de leur passage dans le tractus gastro-intestin*al.* À ce jour, les données recueillies restent encore restreintes et obtenues dans des conditions expérimentales simples restant éloignées de celles observées dans le tractus digestif de l'Homme.

2.3.2.1. Acidité

Les *E. coli* possèdent différents systèmes de résistance à l'acidité (AR2 à 5, HdeA et B), détaillés au **paragraphe 2.3.1**, permettant de survivre au transit gastrique. En plus de l'expression de systèmes de résistance à l'acidité, l'exposition à des pH acides peut déclencher l'induction ou la répression de certains gènes de virulence des EHEC. House et *al.* (2009) ont analysé les profils d'expression génique obtenus par biopuce à ADN, de souches O157:H7 stressées ou non (pH 3 ou pH 7). Aucun changement dans l'expression des gènes *stx* n'a pu être mis en évidence après un stress acide, tandis que d'autres études ont montré une diminution de la production de Stx par O157:H7 (Yuk et Marshall, 2004 ; Huang et *al.*, 2007). Par ailleurs, le stress acide induit une augmentation de la motilité et de l'adhésion des EHEC et une diminution de l'expression de gènes impliqués dans le système de sécrétion de type III (House et *al.*, 2009). De plus, une adhésine putative surexprimée lors d'un stress acide, YadK, joue un rôle significatif dans l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales (Chingcuanco et *al.*, 2012).

2.3.2.2. Sels biliaires

La bile est un facteur de l'environnement digestif qui contrôle l'expression de facteurs de colonisation et de virulence de plusieurs bactéries entériques, comme *Vibrio cholerae* (Hung et Mekalanos, 2005), *Campylobacter jejuni* (Malik-Kale et *al.*, 2008), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Prouty et *al.*, 2004), ou encore les AIEC (Chassaing et *al.*, 2013). La résistance aux sels biliaires est obtenue grâce à des transporteurs actifs utilisant des pompes à efflux (Begley et *al.*, 2005). L'analyse par biopuce à ADN du transcriptome d'une souche O157:H7 traitée avec des sels biliaires (0,15%) montre une surexpression des gènes *acrA* et *acrB* impliqués dans la formation du système d'efflux AcrABTolC transporteur de sels biliaires (Kus et *al.*, 2011 ; Mesaros et *al.*, 2005). Hamner et *al.* (2013) et Wagner et *al.* (2011) ont montré une sous-expression des gènes *stx2* ; aucun changement dans l'expression des facteurs de virulence portés par le LEE n'a pu être mis en évidence.

2.3.2.3. Ethanolamine

Le renouvellement constant des cellules épithéliales intestinales génère un grand nombre de métabolites issus de la membrane lipidique comme le produit de la décomposition de la phosphatidyléthanolamine, l'éthanolamine. Cette dernière constitue une source d'azote pour les EHEC dans le contenu intestinal des bovins, en raison de l'induction d'un cluster de gènes *eut* codant entre autre pour une sous-unité de l'enzyme catalysant la libération d'ammoniac à partir de l'éthanolamine (Bertin et *al.*, 2011). Parallèlement, des études récentes de Kendall et *al.* (2012) indiquent que l'éthanolamine peut servir de signal environnemental aux EHEC modulant ainsi l'expression de certains facteurs de virulence. En effet, dans un milieu minimum contenant de l'éthanolamine, les EHEC sur-expriment des gènes codant des régulateurs de virulence comme le *ler* (LEE-encoded-regulator), ainsi que *stx2a*. De plus, l'éthanolamine favorise l'apparition des lésions A/E dans un modèle cellulaire et conduit à la sur-expression des gènes fimbriaux, i.e. loc2 (*yad*), loc7 (*csg, curli*), loc10 (*stf*), loc11 (*yra*) et loc12 (*lpf1*) (Gonyar et Kendall, 2014). EutR est un régulateur transcriptionnel qui active l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de l'éthanolamine en réponse à ce dernier et à la vitamine B12 (Luzader et *al.*, 2013). Les loci fimbriaux régulés par l'éthanolamine sous la dépendance de EutR sont loc2, loc7, loc11 et loc12 (Gonyar et Kendall, 2014).

2.3.2.4. Microbiote intestinal et métabolites fermentaires

Lors de leur passage dans le tractus digestif, les EHEC sont en contact au microbiote intestinal et à ses produits fermentaires. Les interactions entre le microbiote intestinal et les EHEC restent peu documentées. Le quorum sensing est un système de signalisation intercellulaire par lequel une bactérie appréhende la densité de population des bactéries de son environnement, et le cas échéant régule l'expression de certain de ses gènes. Le microbiote intestinal produit des molécules signalisatrices de quorum sensing, dont l'autoinducteur 3 (AI-3). Ce dernier est détecté par les EHEC et induit une augmentation de la synthèse flagellaire et de la motilité. Cette augmentation de la motilité permettrait à l'agent pathogène d'approcher au plus près de l'épithélium intestinal (Barnett Foster 2013). Chez les EHEC, le quorum sensing apparait comme un mécanisme global de régulation qui contrôle des facteurs de virulence (Connolly et *al.*, 2015a ; Smith et *al.*, 2014 ; Walters et Sperandio, 2006). Cependant, d'autres molécules sécrétées par le microbiote intestinal sembleraient au contraire protéger l'hôte : de Sablet et *al.* (2009) ont montré, *in vitro* et *ex vivo*, que des facteurs solubles libérés par *Bacteroides thetaiotaomicron* répriment la synthèse de Stx2 indépendamment du quorum-sensing.



FIGURE 40. Régulation des gènes flagellaires et du LEE par les AGCC (D'après Tobe et *al.*, 2011)

L'acétate et le propionate activent l'expression des gènes flagellaires indépendamment de la protéine régulatrice Lrp. Le butyrate active l'expression des gènes flagellaires via la protéine régulatrice Lrp et/ou indépendamment. Parallèlement, l'expression des gènes du LEE est activée par le butyrate via le Lrp

Esp : *E. coli*-secreted protein ; **LEE** : Locus d'effacement des entérocytes ; **Ler** : LEEencoded-regulator ; **Lrp** : leucine-responsive regulatory protein ; **T3SS** : système de sécrétion de type III Comme cela a été décrit au paragraphe 1.1.2.7, les principaux métabolites du microbiote présents dans le côlon sont les AGCC dont les majoritaires sont l'acétate, le propionate et le butyrate. Les concentrations en AGCC totales décroissent entre les différentes parties anatomiques du côlon : de 127 mmol/L dans le côlon ascendant à 90 mmol/L dans le côlon descendant (Cummings et *al.*, 1987).

De plus, les AGCC majoritaires induisent une augmentation de la synthèse flagellaire et de la motilité, mais seul le butyrate active simultanément les gènes du LEE et des gènes flagellaires (Connolly et *al.*, 2015a ; Takao et *al.*, 2014 ; Nakanishi et *al.*, 2009). En effet, le butyrate, via la protéine régulatrice Lrp (leucine-responsive regulatory protein), active d'une part les gènes du LEE et d'autre part les gènes régulateurs flhD et flhC. L'activation de la synthèse flagellaire peut également se faire en aval, et indépendamment de flhD et flhC. Ainsi, en fonction des concentrations en AGCC rencontrées dans l'intestin, les EHEC activent la production et la motilité flagellaire, puis les gènes impliqués dans l'adhésion et le système de sécrétion de type III (**FIGURE 40**) (Tobe et *al.*, 2011). Fukuda et *al.* (2011) ont également montré en modèle murin que l'acétate, en renforçant la barrière intestinale, était capable de limiter la translocation des Stx vers le sang protégeant de ce fait les souris d'une infection létale.

2.3.2.5. Niches nutritionnelles

Récemment une étude a montré que les concentrations en biotine, un cofacteur essentiel au sein de l'environnement intestinal étaient plus élevées au niveau de l'intestin grêle que du côlon, site de colonisation des EHEC. Yang et *al.* (2015) ont montré chez des souris qu'un régime riche en biotine au cours d'une infection à EHEC diminuait les niveaux de colonisation des EHEC comparativement aux souris nourries avec un régime standard.

La D-sérine est un acide aminé qui agit comme un régulateur de gène de virulence chez plusieurs pathogènes comme *E. coli* ou *Staphylococcus saprophyticus* (Anfora et *al.*, 2007 ; Korte-Berwanger et *al.*, 2013). Une étude a montré que seuls 1,6 % des *E. coli* isolés étaient à la fois tolérants à la D-sérine et portaient les gènes du LEE. Ils ont montré que la D-sérine réprimait l'expression du LEE (Connolly et *al.*, 2015b). Curtis et *al.* (2014) ont aussi montré que *B. thetaiotaomicron* en modifiant l'environnement métabolique intestinal dans un modèle murin induisait *in fine* l'expression de gène de virulence notamment les gènes du LEE. Enfin, plusieurs études ont montré que le fucose présent dans l'environnement digestif induit

l'expression des gènes du LEE et donc la colonisation par les EHEC (Keeney et Finlay, 2013 ; Pacheco et *al.*, 2012).

2.3.2.6. Adrénaline et noradrénaline

L'expression de plusieurs facteurs de virulence (motilité et formation de lésions A/E) est sous le contrôle du quorum sensing. La régulation des gènes de virulence des EHEC par l'adrénaline et la noradrénaline est complexe et n'est pas encore entièrement connue. Les EHEC utilisent des histidines kinases QseC et QseE comme senseurs des deux hormones. La cascade de signalisation QseC et QseE adrénergique et noradrénergique chez les EHEC est représentée dans la **FIGURE 41**.



FIGURE 41. Cascade de signalisation QseC et QseE adrénergique et noradrénergique chez les EHEC (D'après Hughes et *al.*, 2009)

Les EHEC utilisent QseC et QseE comme senseurs de l'adrénaline et de la noradrénaline. Cette cascade de signalisation participerait, entre autre, au rapprochement des EHEC de l'épithélium intestinal en augmentant la motilité et la formation de lésions A/E.

esp : *E. coli*-secreted protein ; **ler** : LEE-encoded-regulator ; **RE** : réticulum endoplasmique ; **SHU** : syndrome hémolytique et urémique ; **stx** : Shiga-toxine

QseC, via sa parenté avec le régulateur QseB, régule positivement l'expression des gènes flagellaires et des gènes impliqués dans la motilité. QseF et QseC sont capables d'activer la production de Stx. Enfin, QseC régule les gènes du LEE via KdpE (Njoroge et Sperandio, 2012 ; Njoroge et *al.*, 2012). Néanmoins, il semblerait que les EHEC coordonnent les réponses à l'AI-3 produit par le microbiote intestinal en réponse à l'adrénaline et la noradrénaline pour (i) participer au repérage d'un site de colonisation, (ii) augmenter la production de Stx et (iii) améliorer leur approche de l'épithélium intestinal en augmentant la motilité et la formation de lésions A/E (Barnett Foster, 2013 ; Hughes et *al.*, 2009).

2.3.2.7. Oxygène

L'environnement du tractus gastro-intestinal est caractérisé par des concentrations en oxygène variables en fonction de la localisation. De plus, alors que la lumière du tractus intestinal est relativement anaérobie, une zone d'oxygénation existe au voisinage de la surface de la muqueuse qui est générée par diffusion de l'oxygène à partir du réseau de capillaires des microvillosités. Les mécanismes impliqués dans la modulation de la virulence des EHEC par l'oxygène dans l'environnement digestif ne sont pas encore connus (Barnett Foster, 2013). Dans un modèle *in vitro* de culture cellulaire, James et Keevil (1999) ont montré que la présence d'oxygène augmentait la capacité des EHEC à adhérer aux cellules. Plus récemment, il a été montré *in vitro* en culture cellulaire que l'environnement microaérobie de l'intestin humain favorise l'expression des gènes du système de sécrétion de type III (Schüller et Phillips, 2010) et la macropinocytose de Stx2 à travers l'épithélium intestinal humain avec des teneurs en oxygène comprises entre 1,4 et 1,7% (Tran et *al.*, 2014).

2.3.2.8. Monoxyde d'azote

Les cellules de la muqueuse intestinale peuvent développer un programme de défense non spécifique en réponse aux bactéries entéropathogènes. Cette réponse immunitaire innée se caractérise notamment par la synthèse de monoxyde d'azote. Ce dernier est un radical libre qui peut endommager les bactéries et/ou induire des modifications transcriptionnelles via des senseurs. Le monoxyde d'azote peut inhiber la production de Stx par les EHEC et l'expression des gènes du LEE sans altérer leur viabilité (Vareille et *al.*, 2007 ; Branchu et *al.*, 2014).

2.3.2.9. Mouvements péristaltiques

Les organes creux du tube digestif - l'œsophage, l'estomac et l'intestin - sont entourés de muscles qui permettent à leur paroi de se contracter entrainant le brassage des aliments et l'absorption des nutriments. Alsharif et *al.* (2015) ont montré *in vitro* sur culture cellulaire que les forces de cisaillement issues de ces mouvements d'une intensité égale à celle retrouvée dans l'intestin, induisaient l'expression des gènes de LEE via l'activateur de l'opéron Ler.

Pour exemple, l'influence de ces facteurs environnementaux digestifs sur l'expression des gènes de LEE est synthétisée dans la **FIGURE 42**.



FIGURE 42. Facteurs environnementaux digestifs régulant l'expression les gènes du LEE des EHEC (D'après Connolly et *al.*, 2015)

Les facteurs environnementaux régulant l'expression des gènes du LEE sont codés par couleur : le quorum-sensing via la détection d'hormones ou d'AI-3 (violets), détection des éléments nutritifs (orange), la détection du monoxyse d'azote (rose clair), détection du pH et de l'acide aminé D-sérine (rose foncé), détection de l'éthanolamine (gris), détection de la vitamine B8 (biotine) (vert) et détection du butyrate (bleu) Les lignes vertes représentent les gènes cibles activés alors que les traits rouges indiquent une régulation négative.

EA : éthanolamine ; AHL : N-acyle homosérine lactone ; NO : monoxyde d'azote

2.4. Diagnostic et stratégies thérapeutiques des infections à EHEC

2.4.1. Diagnostic

Le diagnostic des infections à EHEC est difficile à réaliser ; les bactéries étant rapidement éliminées du tube digestif, le recueil des selles doit s'effectuer au maximum quatre à six jours après le début des symptômes digestifs. De plus, en particulier au moment du SHU, la diarrhée peut être absente et il est alors indispensable de pratiquer un écouvillonnage rectal pour la recherche des EHEC (**FIGURE 41**). Le diagnostic repose sur la mise en évidence, directement dans les selles et/ou après un enrichissement, des gènes de virulence (*stx* et *eae*), des Shiga-toxines ou de la présence d'anticorps spécifiques antilipopolysaccharides dans le sérum (Mariani-Kurkdjian et Bingen, 2012 ; Mariani-Kurkdjian et Bonacorsi, 2014).



FIGURE 43. Diagnostic d'une infection à EHEC (D'après Mariani-Kurkdjian et Bonacorsi, 2014)

EHEC : *E. coli* entérohémorragiques ; **LPS** : lipopolysaccharide ; **PCR** : polymerase chain reaction ; **PFGE** : électrophorèse en champ pulsé ; **SHU** : syndrome hémolytique et urémique

2.4.1.1. Recherche microbiologique

Les EHEC étant présents en quantité parfois très faible dans les selles (inférieures à 10^2 /g de selles), il est indispensable de réaliser un enrichissement. En médecine humaine, l'eau peptonée tamponnée additionnée de vancomycine et de céfixime est classiquement utilisée comme milieu d'enrichissement. Le diagnostic microbiologique classique d'une infection à EHEC O157:H7 est aisé à mettre en œuvre, dans un bouillon d'enrichissement, par la mise en évidence des caractéristiques biochimiques particulières de ce sérotype, i.e. l'absence de fermentation du sorbitol et l'absence de β -glucuronidase. Ces caractéristiques sont utilisées dans les milieux sélectifs et différentiels comme les milieux Mac Conkey Sorbitol (SMAC), CHROMagar O157:H7 et O157:H7 ID (BioMérieux). Les sérotypes non-O157 n'ont pas de propriété biochimique commune permettant leur isolement sélectif sur un milieu particulier. Leur recherche nécessite d'avoir recours à des méthodes moléculaires et consiste en la mise en évidence de facteurs de virulence (Mariani-Kurkdjian et Bingen, 2012). Cependant, une technique permettant de détecter et de différencier les colonies des sept principaux sérogroupes de STEC (O26, O45, O103, O111, O121, O145 et O157) sur différents milieux chromogènes sélectifs en fonction des modèles de dispersion optique a été récemment développée par Tang et al. (2014); cette technique est appelée BARDOT (BActerial Rapid Detection using Optical scattering Technology).

2.4.1.2. Recherche de gènes de virulence

Compte-tenu de la présence en faible quantité des EHEC dans les selles, l'amplification génique *in situ* par PCR (polymerase chain reaction) basée sur la recherche des gènes *stx* et/ou *eae* représente la méthode la plus sensible. En cas de détection d'un des gènes de virulence des EHEC par PCR, l'isolement de la bactérie est indispensable pour caractériser la souche pathogène (Espié et *al.*, 2008).

2.4.1.3. Recherche de Shiga-toxines dans les selles

La technique de référence pour la recherche de Shiga-toxines libres sur filtrat de selles est la cytotoxicité sur cellules Vero ou HeLa, spécifique si elle est neutralisée par un antisérum anti-Stx (Fach et *al.*, 2003). Cependant, des techniques immunologiques de type ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ont été développées, e.g. PremierR EHEC test

(Meridian Bioscience) ou encore RidascreenR Verotoxin Enzyme Immunoassay (R-Biopharm) (Beutin 2006 ; Willford et *al.*, 2009).

2.4.1.4. Sérodiagnostic

Dans la majorité des cas, les malades développent des anticorps antilipopolysaccharides dont la détection par ELISA, Western-blot, immunoblotting ou hémagglutination indirecte. Le diagnostic sérologique doit être réalisé sur un sérum « précoce » et un sérum « tardif », afin de rechercher la présence d'IgG, d'IgM et d'IgA antilipopolysaccharides. Ces trois classes d'anticorps sont détectables précocement et permettent d'attester d'une infection à EHEC même plusieurs semaines après le début des symptômes digestifs. De plus, la recherche de ces anticorps est indispensable pour le diagnostic en complément de la PCR et pour des études épidémiologiques lorsque la mise en évidence directe des gènes de virulence des EHEC est impossible dans les selles (Espié et *al.*, 2008 ; Mariani-Kurkdjian et Bingen, 2012).

2.4.2. Stratégies thérapeutiques

2.4.2.1. Traitement utilisés

Il n'existe, à ce jour, aucun traitement étiologique des infections à EHEC. Seul un traitement symptomatique du SHU est possible (diurèse forcée, hémodialyse, transfert de plasma frais congelé), permettant à la fois de compenser les pertes hydriques dues aux diarrhées et de soutenir les fonctions rénales (Scheiring et *al.*, 2010 ; Tarr et *al.*, 2005). En effet, les niveaux de fluide et l'équilibre électrolytique sont extrêmement importants dans la gestion du développement du SHU (Goldwater et Bettelheim, 2012). Le traitement de cette maladie vise donc à améliorer les complications relatives à la gastroentérologie, l'hématologie, l'angiologie et la néphrologie (Bitzan, 2009). Plusieurs traitements couramment utilisés en clinique pour traiter les infections bactériennes ne sont pas conseillés pour des patients infectés par les EHEC : c'est le cas de l'antibiothérapie, de l'usage d'anti-diarrhéiques et des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (Tarr et *al.*, 2005). En effet, les phages portant les gènes *stx* sont

inductibles comme les autres phages de type λ . Cette induction passe par un système bactérien de réponse au stress : le système SOS. La synthèse de Stx2 est induite par un grand nombre d'antibiotiques dont ceux de la classe des quinolones (Zhang et al., 2000). Ces derniers sont des agents activateurs du système SOS par l'inhibition d'une ADN gyrase, ce qui provoque une altération de l'ADN et une activation de la protéine RecA. Les antibiotiques pourraient favoriser la production de Shiga-toxines par les EHEC et par conséquent avoir un effet négatif sur la santé du patient traité en aggravant ses symptômes (Wong et al., 2000). Cependant, une métaanalyse des vingt études réalisées entre 1982 et 2005, concernant près de 2500 patients, comparant le risque de SHU selon que les patients aient reçu ou non des antibiotiques au stade diarrhéique, n'as pas permis d'exclure l'antibiothérapie du traitement des infections à EHEC. En effet, les données suggèrent que les quinolones, en particulier lorsqu'elles sont administrées rapidement après l'apparition des premiers symptômes cliniques, ne peuvent être contreindiquées (Panos et al., 2006). Néanmoins, l'utilisation des antibiotiques bactéricides n'est pas recommandée chez les patients atteints d'une infection à EHEC (Mariani-Kurkdjian et Bingen, 2012 ; Scheiring et al., 2010 ; Szych et al., 2014). A contrario, l'utilisation d'antibiotiques bactériostatiques, comme l'azythromycine, est envisageable, car elle n'entraîne pas de libération de Stx et permet d'éradiquer les EHEC en trois jours. Cependant, une étude prospective sur l'effet de cet antibiotique au stade diarrhéique ou en début de SHU est nécessaire (Ulinski, 2013).

Par ailleurs, les anti-diarrhéiques ont été associés à un risque accru de développement de SHU ou à des complications neurologiques de la maladie en augmentant la durée du transit intestinal et la probabilité de translocation des bactéries et de leurs toxines (Bell et *al.*, 1997 ; Cimolai et *al.*, 1992 ; Tarr et *al.*, 2005). Enfin, les anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent diminuer le flux sanguin rénal (Murray et Brater, 1993). En outre, ces agents doivent être utilisés avec prudence car leurs métabolites peuvent engendrer une insuffisance rénale (Cimolai et *al.*, 1992 ; Serna et Boedeker, 2008).

La compréhension des mécanismes de l'expression des gènes *stx* et du mode d'action des toxines contribue à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques. Actuellement, les stratégies expérimentales visant à limiter les complications associées aux infections à EHEC sont basées sur l'utilisation décomposés antibactériens, de neutraliseurs de toxines, d'anticorps visant à inhiber des voies métaboliques impliquées dans le processus infectieux et de vaccins (Goldwater et Bettelheim, 2012). Parmi ces stratégies, on peut noter : (i) l'utilisation

d'inhibiteurs du quorum sensing pour moduler négativement l'expression de certains gènes de virulence des EHEC, (ii) la vaccination et l'immunothérapie pour prévenir et traiter ces infections, et (iii) la captation des Stx pour éviter leur liaison au Gb3 des cellules cibles (Pacheco et Sperandio, 2012 ; Rasko et Sperandio, 2010).

2.4.2.2. Traitements en cours de développement

Les EHEC peuvent, via le quorum sensing et plus particulièrement le QseC, déclencher l'expression de gènes flagellaires et du LEE et ainsi favoriser la colonisation de l'hôte. En raison de l'importance de QseC dans la régulation de la virulence des EHEC, un inhibiteur de la régulation de la virulence médiée par QseC a été identifié (LED209) permettant d'empêcher l'autophosphorylation de ce senseur, sans affecter la croissance bactérienne. Cependant, l'efficacité de ces inhibiteurs de quorum sensing n'a pas été testée lors d'essais cliniques chez l'homme (Pacheco et Sperandio, 2012).

Plusieurs stratégies vaccinales ont été utilisées avec un succès variable dans des modèles animaux. Ces stratégies ont impliqué l'utilisation de protéines recombinantes de virulence telles que les Stx, l'intimine, l'EspA, ou encore des protéines de fusion des sous-unités A et B de Stx1 et Stx2. La vaccination de souris avec un vaccin oral à base de plants de tabac recombinants produisant Stx2 les protège contre l'intoxination systémique avec Stx2, létale chez les souris non-immunisées (Wen et *al.*, 2006). Bien que ces résultats soient encourageants, ils doivent être interprétés avec prudence, l'infection à EHEC chez la souris ne reproduisant pas l'infection humaine dans sa globalité (Naylor et *al.*, 2005). De récents tests vaccinaux en modèles animaux ont été réalisés avec plus ou moins de succès (Szu et Ahmed, 2015)

Les Stx se lient aux récepteurs Gb3 présents principalement aux niveaux rénal et cérébral, ce qui provoque des microangiopathies thrombotiques. Ainsi, de nombreux analogues du récepteur Gb3 ont été conçus dans le but de bloquer cette étape de la physiopathologie des infections à EHEC. Cependant, les essais cliniques évaluant l'utilisation de ces composés n'ont pas été concluants (Pacheco et Sperandio, 2012). L'échec d'un traitement par voie orale avec un analogue du récepteur Gb3, le Synsorb Pk (trisaccharide synthétique couplé de manière covalente à une silice qui lie et neutralise les Stx), n'est pas surprenant compte tenu de la rareté

des toxines libres fécales chez les enfants atteints de SHU après une infection à *E. coli* O157:H7 (Pacheco et Sperandio, 2012 ; Tarr et *al.*, 2005).

L'utilisation d'anticorps monoclonaux inhibant l'activation de la fraction C5 du complément (Eculizumab) pourrait être une stratégie prometteuse pour prévenir les complications les plus graves de l'infection à EHEC. En effet, Lapeyraque et *al.* (2011) ont montré que ce composé a permis d'améliorer les fonctions rénales et neurologiques de trois enfants de moins de trois ans avec un SHU sévère lors de l'épidémie allemande de 2011.

Enfin, il a été récemment montré en modèles cellulaire et murin que l'ion manganèse (Mn^{2+}) bloque le trafic des Stx dans l'appareil de Golgi, offrant une nouvelle piste thérapeutique peu onéreuse qui devrait conduire à des essais contrôlés randomisés chez l'homme (Mukhopadhyay et Linstedt, 2012).

Pour conclure, il reste d'importants obstacles à la réussite d'un traitement curatif des infections à EHEC étant donné la complexité de la physiopathologie. Ainsi, il est peu probable que le ciblage d'une seule voie de la physiopathologie soit suffisant dans la réussite d'un traitement, une approche multifactorielle semblant nécessaire.

CHAPITRE 3 :

LA STRATÉGIE PROBIOTIQUE DANS LES INFECTIONS À *Escherichia coli* ENTÉROHÉMORRAGIQUE

SOMMAIRE

3.1. Les	s probiotiques	103		
3.1.1.	Concept de probiotique			
3.1.2.	Caractéristiques d'un probiotique	104		
3.1.3.	Microorganismes à activité probiotique	106		
3.1.4.	Mécanismes d'action des probiotiques	107		
3.1.5.	Potentiel probiotique des levures	111		
3.1.6.	Risques associés aux stratégies probiotiques	114		
3.2. Stratégie probiotique dans la prévention et/ou le traitement des infections à EHEC				

3.1. Les probiotiques

3.1.1. Concept de probiotique

En reliant la longévité des Bulgares à leur grande consommation de yaourt, le prix Nobel de physiologie ou médecine Elie Metchnikoff, a décrit pour la première fois en 1907 l'effet bénéfique de microorganismes vivants provenant des produits laitiers fermentés. Il suggéra alors un régime alimentaire à base d'une bactérie isolée de ces yaourts, le « bacille bulgare », dans le but de modifier le microbiote en remplaçant les microbes nocifs par des microbes utiles. Le concept « probiotique » était né. Ce n'est qu'en 1953 que le terme « probiotique » a été proposé pour la première fois par Werner Kollath, terme dérivé du grec « pro bios », qui signifie

littéralement « en faveur de la vie », pour définir les compléments alimentaires organiques et inorganiques apportés aux personnes souffrant de malnutrition. Depuis, la définition du terme probiotique a évolué dans le temps en fonction de la réflexion des chercheurs, des connaissances scientifiques et des avancées technologiques. La « Food and Agriculture Organization of the United Nations » (FAO) et l'« Organisation Mondiale de la Santé » (OMS) officialisent en 2001 sa définition, réactualisée en 2014, afin d'éviter toute dérive. Les probiotiques sont désormais définis comme « tout microorganisme vivant qui, lorsqu'il est administré en quantité suffisante, exerce un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (FAO/WHO, 2002 ; Hill et *al.,* 2014). Ils sont devenus des acteurs incontournables de développement et d'innovation dans les domaines des industries alimentaires et pharmaceutiques et cette définition pourrait encore évoluer, car les champs de recherche pour mieux connaître et comprendre l'action des probiotiques sont actuellement nombreux.

3.1.2. Caractéristiques d'un probiotique

Pour être considéré comme probiotique, un microorganisme doit regrouper différentes caractéristiques (**TABLEAU 11**). Un probiotique doit être une souche non pathogène, non toxique, non allergique. Les probiotiques utilisés en santé humaine doivent présenter une inocuité totale pour l'hôte et bénéficier du statut GRAS (« Generally Recognized As Safe ») défini par la FDA (« Federal Drug Administration ») aux Etats-Unis et du statut de présomption d'innocuité reconnue ou QPS (« Qualified Presumption of Safety ») défini par l'EFSA (« European Food Standard Agency ») en Europe. Un probiotique doit être vivant et actif dans l'environnement digestif. Ainsi il doit survivre à l'acidité gastrique et aux sels biliaires intestinaux, persister temporairement dans le tractus digestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte dans le tractus gastro-intestinal (Dunne et *al.* 2001; Sanders 2008).

CRITÈRES DE SÉCURITÉ Identification taxonomique exacte Non toxique, non pathogène, GRAS et/ou QPS Pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques **CRITÈRES TECHNOLOGIQUES** Viabilité et stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini (106 à 108 UFC/g) Conservation des propriétés probiotiques après la production Qualités organoleptiques souhaitables (ou pas de qualités indésirables) lorsqu'ils sont inclus dans des aliments ou des procédés de fermentation COMPÉTITIVITÉ Survie et activité métabolique au niveau du site cible in vivo Tolérance à l'acidité, aux sels biliaires et aux enzymes digestives Capable de rivaliser avec le microbiote résident et les métabolites fermentaires Adhésion et colonisation potentielle PERFORMANCES ET FONCTIONNALITÉS Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé (efficacité documentée et prouvée dans des études in vitro et in vivo contrôlées chez l'Homme) Action antagoniste vis-à-vis de bactéries pathogènes Production de substances anti-microbiennes et/ou bioactives (enzymes, peptides, bactériocines, péroxyde d'hydrogène, acides organiques ou autres composés inhibiteurs) Propriétés immunostimulantes Anti-mutagène et anti-cancérigène

TABLEAU 11. Principaux critères de sélection des souches probiotiques (Modifié d'après Klaenhammer et Kullen, 1999)



Une unique souche probiotique remplit rarement la totalité des critères de sélection énoncés ci-dessus. Par ailleurs, les effets exercés par les probiotiques sont spécifiques à une souche considérée et ne peuvent être extrapolés d'une souche à l'autre, même si elles appartiennent au même genre ou à la même espèce. Dans la pratique, le choix d'un produit probiotique réalisable d'un point de vue industriel et économique résulte toujours d'un bon compromis entre les différentes propriétés bénéfiques et les conditions de production des souches testées.

3.1.3. Microorganismes à activité probiotique

Les probiotiques sont des bactéries ou des levures ingérées vivantes, présentes ou non dans le microbiote intestinal résident. Les microorganismes probiotiques sont principalement représentés par des bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Penner et *al.*, 2005). Toutefois, la souche non pathogène *E. coli* Nissle 1917, certaines souches de *Bacillus subtilis* et les levures du genre *Saccharomyces* sont également considérées comme probiotiques (TABLEAU 12).

TABLEAU 12. Principaux microorganismes utilisés en tant que probiotiques chez l'Homme (D'après de Penner et *al.*, 2005)

Lactobacilles	Bifidobactéries	Champignons	Autres
<i>Lactobacillus plantarum</i> (Bron et <i>al.</i> , 2004)	Bifidobacterium longum (Klijn et al.,, 2005)	Saccharomyces cerevisiae (Comitini et al., 2009)	Streptococcus thermophilus (Rul et al., 2011)
L. acidophilus	B. bifidum	Saccharomyces cerevisiae	Streptococcus thermophilus
L. casei	B. infantis	Saccharomyces boulardii	Enterococcus faecium
L. delbrueckii subp	B. longum		Lactococcus lactis
Bulgaricus	B. thermophilum		Propionibacterium
L. reuteri	B. adolescents		freudenreichii
L. brevis	B. lactis		Escherichia coli Nissle 1917
L. cellobiosus	B. animalis		Bacillus clausii
L. curvatus	B. breve		Bacillus oligonitrophilis
L. fermentum			
L. plantarum			
L. rhamnosus (GG)			
L. salivarius			
L. gasseri			
L. johnsonii			
L. helviticus			
L. farciminis			

Les probiotiques représentent aujourd'hui un poids économique majeur (39 milliards d'euros par an dans le monde en 2007), en constante augmentation, cette dynamique étant soutenue par le lien existant entre l'alimentation et les bénéfices santé (Caselli et *al.*, 2013). Les principales souches utilisées dans l'industrie agro-alimentaire sont *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173010 et *Lactobacillus casei* DN-114001 respectivement dans l'Activia et l'Actimel commercialisés par Danone[®]; et dans l'industrie pharmaceutique *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745 dans l'UltraLevure de Biocodex[®] (McFarland, 2015).

3.1.4. Mécanismes d'action des probiotiques

Les modes d'action par lesquels certains probiotiques exercent des effets prophylactiques ou curatifs ne sont pas complétement élucidés, mais plusieurs mécanismes ont été proposés (FIGURE 44).



FIGURE 44. Mécanismes d'action connus des probiotiques et leur fréquence (Modifié d'après Hill et *al.*, 2014)

AGCC : acide gras à chaîne courte

Les mécanismes d'action majeurs des probiotiques comprennent (i) l'antagonisme direct, (ii) la modulation du système immunitaire et (iii) l'exclusion (FIGURE 45) (Bermudez-Brito et *al.*, 2012 ; O'Toole et Cooney, 2008).



FIGURE 45. Schéma illustrant les principaux mécanismes d'action des probiotiques (D'après O'Toole et Cooney, 2008)

Le mode d'action des probiotiques envers des microorganismes pathogènes peut être divisé en trois. Dans l'**antagonisme direct**, les probiotiques peuvent inhiber la croissance du pathogène par production de composés antimicrobiens ou exercer une action antagonisme sur les facteurs de virulence. Les probiotiques peuvent interagir avec le système immunitaire (l'**immunomodulation**) en favorisant la réponse immune innée ou adaptative de l'hôte ; ou en limitant la capacité du pathogène à induire une réponse inflammatoire. À travers l'**exclusion**, les probiotiques peuvent bénéfiquement modifier le microbiote intestinal, augmenter la fonction barrière de l'épithélium intestinal, ou encore limiter l'adhésion, l'entrée ou la translocation du pathogène.

 $\label{eq:IEC} \begin{array}{l} \textbf{IEC}: \textbf{cellule épithéliale intestinale ; DC}: \textbf{cellule dendritique ; B}: lymphocyte B ; T : lymphocyte T ; \\ \textbf{Treg}: lymphocyte T régulateur ; Th : lymphocyte T auxiliaire ; IL-10 : interleukine 10 ; TGF\beta : \\ facteur de croissance transformant \beta \end{array}$

3.1.4.1. Antagonisme direct

L'antagonisme direct regroupe l'ensemble des mécanismes visant spécifiquement à inhiber la croissance du pathogène par la production de composés antimicrobiens ou exercer une action antagoniste sur les facteurs de virulence nécessaires à leur pathogénicité (Preidis et *al.*, 2011 ; Oelschlaeger, 2010).

Les lactobacilles sont souvent associés à la production de bactériocines, molécules de nature protéique synthétisées par voie ribosomique possédant des propriétés antibiotiques. Ainsi, *Lactobacillus salivarius* UCC118 est capable de produire une bactériocine dirigée contre *Listeria monocytogenes* (O'Shea et *al.*, 2011). La production de bactériocines par les souches de bifidobactéries est moins documentée. Néanmoins, il a été rapporté que la souche *Bifidobacterium bifidum* NCFB1454 produit une bactériocine active contre différents pathogènes (Poltavska et Kovalenko, 2012).

3.1.4.2. Immunomodulation

Les bactéries probiotiques ont la capacité d'interagir avec les cellules épithéliales et dendritiques, les monocytes/macrophages et les lymphocytes. Le système immunitaire présente deux composantes, i.e. le système inné et le système adaptatif. Le système immunitaire inné répond à des structures communes partagées par la plupart des agents pathogènes, les PAMP (pathogen-associated molecular patterns). La première réponse aux agents pathogènes est déclenchée par des récepteurs cellulaires épithéliaux capables de reconnaître ces PAMP, les PRR (pattern recognition receptor) comme les TLR (toll-like receptors), le CLR (C-type lectin receptors) ou encore les NLR (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein (NOD)-like receptors) permettant une localisation efficace du pathogène (Lebeer et *al., 2010).* La réponse immunitaire adaptative dépend quant à elle des lymphocytes B et T, qui sont spécifiques à des antigènes particuliers. Tout comme les bactéries du microbiote résident, les probiotiques peuvent interférer avec le système immunitaire de l'hôte en favorisant la réponse immune innée ou adaptative de l'hôte et en limitant la capacité du pathogène à induire une réponse inflammatoire.

3.1.4.3. Exclusion

L'exclusion est utilisée comme un terme regroupant tous les mécanismes antagonistes aspécifiques qui rendent l'environnement du tractus digestif moins hospitalier pour les agents pathogènes. Ces mécanismes comprennent l'amélioration de la fonction de barrière intestinale mais aussi l'exclusion compétitive de micro-organismes pathogènes.

L'épithélium intestinal est en contact permanent avec le contenu de la lumière du tube digestif. La barrière intestinale est un mécanisme de défense majeur dans la protection de l'organisme. Une couche de mucus, les complexes de jonction des cellules épithéliales et la production de peptides antimicrobiens et d'immunoglobulines A (IgA) sécrétoires assurent l'intégrité de l'épithélium intestin*al.* Lorsque cette fonction de barrière est altérée, des antigènes bactériens peuvent atteindre la sous-muqueuse et induire une réponse inflammatoire à l'origine de troubles intestinaux. Il a été suggéré que les probiotiques pourraient favoriser la sécrétion de mucus, moduler l'expression de gènes codant les protéines constitutives des jonctions serrées ou encore prévenir l'apoptose cellulaire induite par des cytokines pro-inflammatoires ; cependant les mécanismes impliqués ne sont pas entièrement connus (Bermudez-Brito et *al.,* 2012).

Les mécanismes utilisés par une souche probiotique visant à exclure ou à réduire la croissance d'autres espèces microbiennes dans l'environnement digestif sont variés : (i) la création d'un microenvironnement hostile en modifiant le microbiote résident, (ii) la réduction de la disponibilité des récepteurs des microorganismes pathogènes afin de limiter leur adhésion à l'épithélium intestinal, leur entrée ou leur translocation, (iii) la diminution du pH de la lumière intestinale par la production d'acides organiques, en particulier l'acétate et le lactate, (iv) l'épuisement compétitif des nutriments essentiels à la survie du pathogène (Bermudez-Brito et *al.,* 2012 ; Preidis et *al.,* 2011).

3.1.5. Potentiel probiotique des levures

En tolérant les conditions rencontrées dans l'environnement digestif humain et en exerçant une action antagoniste vis-à-vis de bactéries pathogènes, plusieurs espèces de levures ont montré des propriétés probiotiques intéressantes : *Debaryomyces hansenii, Torulaspora delbrueckii* (Psani et Kotzekidou, 2006), *Kluyveromyces lactis, Yarrowia lipolytica* (Chen et *al.,* 2010), *Kluyveromyces marxianus, Kluyveromyces lodderae* (Kumura et *al.,* 2004) et *Saccharomyces cerevisiae* (Etienne-Mesmin, Livrelli, et *al.,* 2011 ; Hatoum et *al.,* 2012). L'effet antagoniste des levures vis-à-vis des micro-organismes pathogènes a été attribué principalement à (i) la compétition pour les éléments nutritifs, (ii) des changements de pH dans le milieu à la suite d'une augmentation de la production d'acides organiques par le microbiote intestinal, (iii) la production d'éthanol et (iv) la sécrétion et la libération de composés antimicrobiens comme des composés organiques volatils (Fialho et *al.,* 2009 ; Hatoum et *al.,* 2012).

Par ailleurs, les probiotiques à base de levures peuvent interagir positivement avec des probiotiques bactériens en améliorant leur survie dans l'environnement digestif et en stimulant leur croissance. En effet, cette synergie pourrait être attribuée à la production par les levures de nutriments tels que des peptides, des acides aminés et/ou des vitamines (Hatoum et *al.*, 2012). De plus, la paroi cellulaire des levures est principalement composée de glucanes, de mannanes et de chitines. Ces composants peuvent jouer un rôle dans les phénomènes d'adhésion permettant d'augmenter la survie des bactéries probiotiques dans l'environnement digestif (Millsap et *al.*, 1998).

3.1.5.1. Les levures probiotiques du genre *Saccharomyces*

Saccharomyces cerevisiae est un organisme eucaryote unicellulaire, aérobie facultatif qui appartient au règne des *fungi* et au phylum des Ascomycètes. Saccharomyces cerevisiae var boulardii est une levure d'origine naturelle, non génétiquement modifiée, isolée à partir de l'écorce de lychees en Indochine. Saccharomyces boulardii est une espèce voisine de Saccharomyces cerevisiae dont elle se distingue par différentes caractéristiques taxonomiques, métaboliques et génétiques (Rambaud, 2004).
TABLEAU 13. Liste des médicaments commercialisés en France contenant des levuresS. cerevisiae ou S. boulardii (d'après http://www.vidal.fr/, consulté en août 2015)

Levure utilisée	NOM DU MÉDICAMENT	FORME PHARMACEUTIQUE	INDICATIONS THÉRAPEUTIQUES
S. boulardii	ULTRA-LEVURE®	Traitement symptomatique des diarrhées post- antibiotiques	Gélules
	ACTISOUFRE®	Traitement des états inflammatoires des rhinites et des rhinopharyngites chroniques	Suspension buvable et nasale
	CALCIFORTE [®]	Traitement des carences en calcium (lors des périodes de croissance, grossesse, allaitement) ou de décalcification osseuse (ostéoporose, immobilisation prolongée ou traitement prolongé par la cortisone)	Solution buvable Poudre pour solution buvable
S. cerevisiae	CARBOLEVURE [®]	Troubles fonctionnels intestinaux, diarrhées, météorisme	Gélules
	SOLACY®	Traitement des affections rhino-pharyngées	Gélules et comprimés
	SPASMAG®	Traitement des carences en magnésium (irritabilité, troubles mineures du sommeil, fatigue)	Gélules Solution buvable

TABLEAU 14. Liste des maladies aigües et chroniques pour lesquelles la levure *S. boulardii* a montré une efficacité clinique (modifié d'après Kelesidis et Pothoulakis, 2012)

Maladies aigües

- 1. Diarrhée associée aux antibiotiques
- 2. Infection à *Clostridium difficile*
- 3. Diarrhée aigüe
- 4. Diarrhée persistante
- 5. Diarrhée associée à une nutrition parentérale
- 6. Diarrhée du voyageur
- 7. Infection à Helicobacter pylori

Maladies chroniques

- 1. Maladie de Crohn
- 2. Rectocolite hémorragique
- 3. Syndrome de l'intestin irritable
- 4. Infections parasitaires
- 5. Diarrhée associée au VIH

Considérée comme non pathogène et classée GRAS, la levure *S. cerevisiae* est utilisée depuis l'Antiquité dans de nombreux procédés alimentaires pour ses capacités fermentatives, notamment pour la fabrication de boissons fermentées, du pain, du kéfir ou de laits fermentés. *S. cerevisiae* peut également être utilisée comme ingrédient dans l'alimentation animale. Les levures sont une source de protéines et de vitamines et leur ajout dans la ration alimentaire favorise la prise de poids de l'animal, augmentant ainsi les rendements de production et pourrait de plus modifier les fermentations ruminales et diminuer les risques d'acidose (Jouany, 2006). *S. cerevisiae* ou *S. boulardii* entrent dans la composition de nombreux médicaments commercialisés en France (TABLEAU 13).

Les principales indications médicales de ces levures sont la prévention et/ou le traitement symptomatique des troubles intestinaux (Guandalini, 2011) et principalement des diarrhées associées à l'antibiothérapie. *S. boulardii* a montré une efficacité clinique dans de nombreuses maladies aigües ou chroniques (**TABLEAU 14**).

Les principaux mécanismes d'action de *S. boulardii* sont (i) l'antagonisme direct ou indirect contre des pathogènes intestinaux, (ii) la modification des voies de signalisation de l'hôte, principalement celles impliquées dans la réponse inflammatoire, (iii) la stimulation du système immunitaire et (iv) des effets trophiques sur la muqueuse intestinale (McFarland, 2010 ; Im et Pothoulakis, 2010 ; Kelesidis et Pothoulakis, 2012).

3.1.5.2. Saccharomyces cerevisiae var cerevisiae CNCM I-3856

S. cerevisiae CNCM I-3856 est une nouvelle souche de levure probiotique récemment commercialisée aux Etats-Unis par la société Lesaffre[®] pour un usage chez l'Homme (Lynside Pro GI+, Lesaffre Human Care, USA).

Cette levure (i) a déjà montré des propriétés anti-inflammatoires dans un modèle de colite induite chez la souris (Foligné et *al.*, 2010), (ii) prévient l'augmentation de perméabilité intestinale et les signes de colite induite par les AIEC dans un modèle murin de la maladie de Crohn (Sivignon et *al.*, 2015) et (iii) réduit l'inconfort digestif et les douleurs abdominales chez des patients atteints du syndrome de l'intestin irritable dans un essai clinique (Pineton de Chambrun et *al.*, 2015). Dans cet essai randomisé en double aveugle contre placebo, 200

volontaires présentant des symptômes du syndrome de l'intestin irritable ont consommé 500 mg/jour de Lynside® Pro GI+ (8 x 10^9 UFC/g) pendant 8 semaines. La consommation de levures a permis une amélioration des désordres intestinaux causés par le syndrome de l'intestin irritable : diminution de la douleur et de l'inconfort abdominal/intestinal, des ballonnements, des flatulences et des difficultés à déféquer (Pineton de Chambrun et *al.*, 2015). Il a également été montré dans un modèle d'hypersensibilité colique chez le rat que cette levure avait des effets analgésiques sous la dépendance des récepteurs PPAR α («Peroxysome Proliferator-Activated Receptor») (Rousseaux et *al.*, 2010).

Des études sur cellules intestinales porcines ont également montré que la levure *S. cerevisiae* CNCM I-3856 peut diminuer la synthèse de cytokines pro-inflammatoires induite par une infection à ETEC (Zanello et *al.*, 2011). Récemment, Jawhara et *al.* (2012) ont montré dans un modèle de souris traitée au DSS, que l'administration de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 diminuait l'inflammation intestinale et la colonisation par *Candida albicans*.

Enfin, deux études ont exploré l'influence de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 sur le comportement d'une souche EHEC de sérotype O157:H7 dans l'environnement digestif humain *in vitro*. Etienne-Mesmin et *al.* (2011b) ont montré en conditions digestives humaines simulées une action inhibitrice de la souche *S. cerevisiae* CNCM I-3856 co-administré avec *E. coli* O157:H7. Dans le système digestif artificiel TIM 1, la reprise de croissance du pathogène est significativement diminuée dans les parties distales de l'intestin grêle en présence du probiotique. Dans l'environnement colique humain *in vitro*, Thévenot et *al.* (2013) ont montré en utilisant un fermenteur de type semi-continu (le système ARCOL) que la co-administration de la levure avec O157:H7 n'influençait pas la survie du pathogène.

3.1.6. Risques associés aux stratégies probiotiques

Compte tenu de l'utilisation courante des probiotiques dans le monde et de la sécurité d'emploi des probiotiques actuelle, seul un nombre limité d'événements indésirables graves (bactériémie et fongémie) a été associé à ces traitements. De rare cas d'infections locales ou systémiques incluant des septicémies ou des endocardites ont été rapportés impliquant principalement les espèces *Enterococcus faecium* et *E. faecalis* mais aussi des lactobacilles et des bifidobactéries. Une trentaine de cas de fongémie ont aussi été rapportés chez des malades traités par *Saccharomyces boulardii* principalement chez des patients immunodéprimés, ayant un cathéter ou présentant une muqueuse digestive très endommagée (Segarra-Newnham, 2007). D'une manière générale, les thérapies à base de probiotiques sont à proscrire chez les patients immunodéprimés et les enfants atteints du syndrome du grêle court (Surawicz et Damman, 2014). Dans de rares cas, les probiotiques peuvent aussi aggraver une pathologie. Ainsi, un essai clinique randomisé sur l'utilisation de probiotiques chez des patients atteints de pancréatite aiguë sévère a montré une augmentation des complications infectieuses dans les groupes probiotique et placebo, avec une augmentation de la mortalité dans le groupe probiotique par rapport au groupe placebo (Besselink et *al.*, 2008). Cependant, Reid et *al.* (2008) ont émis des réserves sur la méthodologie employée dans cette étude en invoquant un biais de randomisation des patients.

3.2. Stratégie probiotique dans la prévention et/ou le traitement des infections à EHEC

L'absence de traitement spécifique des infections à EHEC et le fait que l'antibiothérapie soit controversée – augmentation du risque de complications en cas de diarrhées sanglantes – ont conduit à s'intéresser à des moyens préventifs et/ou curatifs alternatifs comme l'utilisation de probiotiques.

Une revue de littérature présentée à la suite recense, de manière exhaustive et selon les trois modes d'action des probiotiques décrit précédemment, les publications où les probiotiques ont été utilisés dans une stratégie de lutte contre les infections à EHEC chez l'Homme, grâce à l'utilisation de modèles *in vitro* (cellules intestinales en culture et systèmes digestifs artificiels) et de modèles *in vivo* murins d'infection à EHEC.

Des travaux ont montré que les probiotiques peuvent agir directement sur les EHEC soit en inhibant leur croissance par la production de composés antimicrobiens et/ou soit en diminuant leur virulence. Ainsi un traitement préventif avec *Clostridium butyricum* permet de diminuer la survie des EHEC dans le tractus gastro-intestinal en modèle murin et parallèlement, via la production de butyrate, inhibe l'expression des gènes *stx* le principal facteur de virulence des EHEC (Takahashi et *al.*, 2004).

Les probiotiques peuvent également être utilisés pour moduler le système immunitaire de l'hôte en favorisant la réponse immune innée ou adaptative tels que *L. casei* ou *L. rhamnosus* capables d'induire la sécrétion d'IgA spécifiques aux *E. coli* O157:H7 (Ogawa et *al.,* 2001 ; Shu et Gill, 2002) et en limitant la capacité du pathogène à induire une réponse immunitaire. Des études, *in vitro* et *in vivo* en modèle murin indiquent que des souches *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* peuvent entraîner une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induite par *E. coli* O157:H7.

Enfin, les probiotiques peuvent être utilisés dans une stratégie d'exclusion des EHEC : (i) des probiotiques du genre *Lactobacillus* peuvent diminuer l'adhésion du pathogène aux cellules épithéliales intestinales (Arena et *al.*, 2014 ; Turková et *al.*, 2013), (ii) *S. boulardii*

permet d'augmenter l'intégrité de la barrière intestinale en inhibant le réarrangement du cytosquelette induit par les EHEC (Dahan et *al.*, 2003) ou encore (iii) la sécrétion d'acides organiques par des probiotiques du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* acidifiant le milieu entraîne une diminution de la survie du pathogène et de l'expression des gènes *stx* (Asahara et *al.*, 2004 ; Carey et *al.*, 2008).

Cette revue de littérature met aussi en avant les limites actuelles de la stratégie probiotique contre les EHEC. En effet, les travaux réalisés sont néanmoins essentiellement descriptifs et les mécanismes impliqués peu connus et restent à être élucidés. De plus, de par le caractère pathogène des EHEC, les études cliniques chez l'Homme de l'efficacité d'un probiotique restent inenvisageable. L'ensemble de ces paramètres doivent être pris en compte avant d'envisager une commercialisation pour une application des probiotiques chez l'Homme lors d'épidémies à EHEC.

Revue de littérature

Probiotic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: An effective strategy against a deadly enemy?

2016 – Critical Reviews in Microbiology – (Impact factor₂₀₁₅ : 8.192)

<u>Charlotte CORDONNIER</u>, Jonathan THÉVENOT, Lucie ETIENNE-MESMIN, Monique ALRIC, Valérie LIVRELLI & Stéphanie BLANQUET-DIOT





Critical Reviews in Microbiology

ISSN: 1040-841X (Print) 1549-7828 (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/imby20

Probiotic and enterohemorrhagic Escherichia coli: An effective strategy against a deadly enemy?

Charlotte Cordonnier, Jonathan Thévenot, Lucie Etienne-Mesmin, Monique Alric, Valérie Livrelli & Stéphanie Blanquet-Diot

To cite this article: Charlotte Cordonnier, Jonathan Thévenot, Lucie Etienne-Mesmin, Monique Alric, Valérie Livrelli & Stéphanie Blanquet-Diot (2017) Probiotic and enterohemorrhagic Escherichia coli: An effective strategy against a deadly enemy?, Critical Reviews in Microbiology, 43:1, 116-132, DOI: 10.1080/1040841X.2016.1185602

To link to this article: http://dx.doi.org/10.1080/1040841X.2016.1185602



Published online: 01 Nov 2016.



🖉 Submit your article to this journal 🗹



View related articles 🗹



View Crossmark data 🗹

Full Terms & Conditions of access and use can be found at http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=imby20

REVIEW ARTICLE



Probiotic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: An effective strategy against a deadly enemy?

Charlotte Cordonnier^{a,b}, Jonathan Thévenot^{a,b}, Lucie Etienne-Mesmin^{a,b}, Monique Alric^a, Valérie Livrelli^{b,c} and Stéphanie Blanquet-Diot^a

^aEA 4678 CIDAM, "Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament", Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France; ^bM2iSH, "Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte", UMR Inserm/Université d'Auvergne U1071, USC-INRA 2018, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France; ^cService de Bactériologie, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

ABSTRACT

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are major food-borne pathogens that constitute a serious public health threat. Currently, there is no specific treatment available for EHEC infections in human creating an urgent need for the development of alternative therapeutic strategies. Among them, one of the most promising approaches is the use of probiotic microorganisms. Even if many studies have shown the antagonistic effects of probiotic bacteria or yeast on EHEC survival, virulence, adhesion on intestinal epithelium or pathogen-induced inflammatory responses, mechanisms mediating their beneficial effects remain unclear. This review describes EHEC pathogenesis and novel therapeutic strategies, with a particular emphasis on probiotics. The interests and limits of a probiotic-based approach and the way it might be incorporated into global health strategies against EHEC infections will be discussed.

ARTICLE HISTORY

Received 12 October 2015 Revised 25 March 2016 Accepted 30 April 2016 Published online 16 September 2016

KEYWORDS

Food-borne pathogen; enterohemorrhagic *Escherichia coli*; innovative treatment; probiotic; gastrointestinal tract

Introduction

Escherichia coli is a paradigm for a versatile bacterial species which comprises harmless commensals as well as pathogenic variants with the ability to cause either intestinal or extra-intestinal diseases in humans. Among pathogenic groups responsible for enteric diseases in humans, enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) are of serious public health concern because of their association with large outbreaks worldwide and life-threatening complications (Bryan et al., 2015; Smith et al., 2014). EHEC cause more than two million acute illnesses annually worldwide (Majowicz et al., 2014). In particular, in 2011, a major outbreak involving the enteroaggregative EHEC O104:H4 occurred in central Europe affecting nearly 4000 individuals and resulting in 54 deaths (Frank et al., 2011). Although many serotypes have been linked with human illness, most of the reported outbreaks and sporadic cases of EHEC infection have been associated with the O157:H7 serotype. Ruminants, especially cattle, are a natural reservoir of the pathogen and infection is typically acquired through the ingestion of contaminated food (mainly undercooked beef products, unpasteurized milk and vegetable) or water,

through direct contact with animals or via person-toperson transmission (Persad & LeJeune, 2014). The spectrum of EHEC-associated disease ranges from mild watery diarrhea to hemorrhagic colitis and in severe cases to the hemolytic-uremic syndrome (HUS) that can lead to mortality, especially in children under 5 years of age. HUS occurs in 5-10% of EHEC infections as a result of exposure to Shiga-toxins (Stx), the main virulence factor of the pathogen, and is characterized by a triad of acute kidney failure, microangiopathic hemolytic anemia and thrombocytopenia (Karpman & Ståhl, 2014; Keir, 2015). Hence, HUS remains the most common cause of acute renal failure in children in the EU and the US. Elderly mostly develop another complication referred as the thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) which differs from HUS because of neurological symptoms including lethargy, severe headache, convulsions and encephalopathy (Karpman & Ståhl, 2014). What makes EHEC particularly redoubtable is the very low infectious dose: less than 50 to a few hundred organisms are usually sufficient to lead to clinical signs (Smith et al., 2014). Currently, treatment consists primarily of supportive therapy and conventional antibiotic

CONTACT Dr. Stéphanie Blanquet-Diot 🐼 stephanie.blanquet@udamail.fr 💽 EA 4678 CIDAM, Université d'Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France © 2016 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

treatment is generally not recommended. The aim of this review is to provide a state of the art on the current treatments of EHEC infections and outline novel therapies, with a particular focus on the use of probiotics. Herein, this review gives an overview of *in vitro* and *in vivo* studies showing beneficial effects of probiotics during EHEC infections, pointing out when described the associated molecular and cellular mechanisms. We also discuss the potential and limits of such probiotic-based approach in a wider context of global health strategies against EHEC pathogens.

Virulence factors – pathogenesis

Even if Stx are clearly identified as the main virulence factor of the pathogen, EHEC pathogenesis is not limited to toxin-mediated effects and a combination of virulence traits is required to make a strain fully pathogenic to humans. In particular, EHEC are well equipped with an arsenal of molecular factors that allows them to survive passage through the gastrointestinal tract and successfully colonize the intestine (Figure 1). After being ingested, the pathogen must breach first the acidic barrier of the stomach (where pH ranges from 2 to 6) to reach its intestinal niche. EHEC have intrinsic acid resistance (AR) systems that enable its survival in the harsh gastric environment by preventing the internal pH from decreasing to lethal levels. Among them, the glutamate-dependent AR system is thought to offer the highest level of protection under such extreme acid conditions (Zhao & Houry, 2010). Since the infectious dose of EHEC is typically very low, such acid resistance is a critical virulence trait of the infection. After passage through the stomach, it is assumed that EHEC colonize the distal parts of the small intestine (Chong et al., 2007) and the colon (Lewis et al., 2015), with a tropism to the follicle-associated epithelium (FAE) of small intestinal Peyer's patches (Chong et al., 2007; Etienne-Mesmin et al., 2011a; Phillips et al., 2000). EHEC colonization involves attaching and effacing (A/E) lesions on the enterocytes, which are characterized by ultra-structural changes including loss of microvilli and intimate attachment of the bacterium to the cell surface (Stevens & Frankel, 2014). Genes encoding A/E lesions formation are localized on a pathogenicity island, the locus for enterocyte effacement (LEE) encoding a bacterial type III secretion system (T3SS). Colonization is mainly mediated by the primary adhesin intimin (encoded by the eae gene) but other putative adherence factors have been described, such as long polar fimbriae (Lpf) or curli (McWilliams & Torres, 2014). In the intestine, EHEC trigger a host acute mucosal inflammatory response (Pearson & Hartland, 2014), characterized

by the production of cytokines with pro-inflammatory (Tumor Necrosis Factor [TNF] and Interleukin-1 [IL-1]) and chemoattractant (Interleukin-8 [IL-8]) functions. Stx, with a central role in the pathogenesis, are produced by EHEC in the lumen of the intestine, and then cross the epithelial barrier, via poorly described mechanisms, to reach the target organs (Schüller, 2011). Two toxin families encoded in the genomes of lysogenic lambdoid phages are produced by the bacteria, namely Stx1 and Stx2, the latter being associated with the most severe complications (Siegler et al., 2003). These protein toxins belong to the group of AB toxins (Bergan et al., 2012). The pentameric B subunit binds to glycosphingolipid receptors, and preferentially to globotriaosylceramide-3 (Gb3), which is expressed on host microvascular endothelial cell surfaces in the kidney, intestine and brain (Bauwens et al., 2013). This specificity determines where Stx mediate their its targeted action. The A subunit exhibits an RNA N-glycosidase activity against the 28S rRNA, resulting in the inhibition of protein synthesis.

Recently, significant advances have been made to understand how specific signals, including host or microbiota-derived metabolic products and various nutrient sources, can modulate expression and function of EHEC virulence factors (Barnett Foster, 2013; Connolly et al., 2015). Then, environmental signals such as short chain fatty acids, ethanolamine, host hormones, variations in fluid shear stress or changes in oxygen and nitric oxide levels can mediate the regulation of EHEC virulence during passage through the human gastrointestinal tract and be important determinants of niche specification (Alsharif et al., 2015; Branchu et al., 2014; Tran et al., 2014). Some of these responses and particularly those implying the LEE are involved in a complex network of regulation, including several mechanisms such as quorum sensing (Figure 2). In EHEC, quorum sensing was suggested as a global regulatory mechanism for basic physiological functions of the bacteria, as well as for the control of virulence factors and colonization (Connolly et al., 2015; Smith et al., 2014; Walters & Sperandio, 2006).

Current and novel therapies for EHEC infections

Currently, treatments for EHEC infections only include supportive schemes such as management of anemia, bleeding or fluid and electrolytes imbalance, and aim to manage renal failure and central nervous system symptoms. Clinical observations indicate that conventional therapies for treating enteric bacterial infections, such as antibiotic therapy, antimotility agents, narcotics and non-steroidal anti-inflammatory medicines, are related



Figure 1. EHEC pathogenesis in human: from natural reservoirs to intracellular pathogen. Cattle are a major reservoir of EHEC and fecal shedding is the most important source of human infection. Human contamination mainly occurs through consumption of contaminated bovine-derived products such as meat, milk and dairy products. Ingested bacteria must survive the acidic conditions of the stomach to reach and colonize the distal parts of the intestine. In the intestine, EHEC are responsible for the formation of "attaching and effacing" lesions (A/E lesions) and the development of a strong mucosal innate immune response. A/E lesions are characterized by effacement of microvilli and intimate adherence between bacteria and the epithelial cell membrane. Shigatoxins (Stx) produced by the bacteria in the intestinal lumen are assumed to cross the human intestinal epithelium by different routes: (1) a Gb3-independent transcellular pathway, (2) a paracellular transport due to redistribution of intercellular tight junction proteins caused by EHEC infection, (3) a release of toxin in the *lamina propria* subsequent to EHEC translocation through Peyer's patches, capture by underlying macrophage and cell apoptosis, (4) a Gb3-dependent internalization of Stx, retrograde transport, cell death and Stx release in the *lamina propria* (Schüller, 2011). Stx will thereafter reach the bloodstream and disseminate to their target organs (kidneys and brain), leading to serious life-threatening complications associated with EHEC infection.

to an increase of HUS or neurological complications and may be not recommended for treatment of EHECinfected patients (Pacheco & Sperandio, 2012). Antibiotics such as quinolones and mitomycin C have been shown to increase the release of Stx upon cell lysis or their production through the SOS response-triggered induction of Stx-producing prophages (Kimmitt et al., 2000). There is therefore a lack of specific therapies to clear the infection or to prevent its related sequelae. EHEC infections represent a notable economic burden due to costs related to the loss of productivity, medical care, decrease in the quality of life and death (Smith et al., 2014). In this context, given the increasing number of HUS caused by Stx and the development of



Figure 2. Regulation of EHEC gene expression in the human digestive environment by quorum sensing. Bacteria can release signaling molecules known as autoinducers (Als) into the surrounding environment to communicate with each other. This communication known as quorum sensing (QS) refers to a regulation system that controls gene expression according to modifications of cell population density. In EHEC, the expression of several virulence genes is controlled by QS and the AI-3 system seems to play the main role. In human digestive environment, EHEC can sense two classes of signals to activate their virulence genes, the first is the bacterial aromatic autoinducer (AI-3) produced by resident microbiota and the second is the catecholamine class of hormones and in particular epinephrine/norepinephrine produced by the host. The EHEC sensor kinase, QseC, autophosphorylates in response to each of these signals and initiates a complex signaling cascade that regulates expression of genes encoding proteins involved in AE lesion formation and mobility (Reading et al., 2007; Walters and Sperandio, 2006). The only gene known to be regulated by AI-2 in EHEC encodes an ABC transporter named Lsr (LuxS-regulated), responsible for the AI-2 uptake. Once inside the cell, AI-2 interacts with LsrR involved in the repression of *lsr* operon expression. Previous studies have assigned type III secretion and the flagella regulon in EHEC to AI-2 and Sperandio et al. (2003) have shown that AI-3 was the signaling molecule.

hypervirulent and antibiotic-resistant strains, there is an urgent need to develop alternative therapies for EHEC infections.

The increasing knowledge on the regulation and mechanisms of action of EHEC virulence factors has contributed to the development of new strategies to counteract the effects of the pathogen and/or to prevent diseases (Goldwater & Bettelheim, 2012; Pacheco & Sperandio, 2012). Among the possible therapeutic options, the use of agents that link Stx, block their binding at the cell surface (synthetic and natural binders, antibodies) or inhibit their intracellular transport (e.g. Mn²⁺ which blocks endosome-to-Golgi trafficking of

Stx) has been considered. In particular, clinical trials have been conducted with SYNSORB Pk, a drug constituted by silicon dioxide containing the trisaccharide moiety of Gb3, which is assumed to compete with the host cell receptor for Stx binding (MacConnachie & Todd, 2004; Thomas & Elliott, 2013; Trachtman et al., 2003). Unfortunately, the drug did not reduce the severity of the disease. Other strategies involve antibodies against key pathogenetic pathway elements to interrupt pathological process, such as inhibition of terminal complement complex formation. Promising results have been obtained in a small clinical pilot study with Eculizumab, a humanized monoclonal anti-C5 antibody that blocks the alternative complement pathway (Lapeyraque et al., 2011). A vaccine against EHEC is still not commercially available. However, several vaccine strategies have been used with variable success in a number of animal models, mainly in mouse or piglet (Garcia-Angulo et al., 2013). Recent vaccine candidates that have been evaluated include those composed of virulence factors alone or as fused-subunits (Stx, intimin or E. coli secreted protein A), DNA-based vaccines, attenuated bacteria and bacterial ghosts. Despite the apparent success of some of these approaches in human trials (Pacheco & Sperandio, 2012; Szu & Ahmed, 2014), there remains significant barriers for the successful treatment of EHEC infections due to the complexity of pathogenesis. It is unlikely that targeting a single pathway with a treatment modality will be sufficiently efficient in EHEC infections. Therefore, broader spectrum approaches using quorum sensing inhibitors (Connolly et al., 2015; Pacheco & Sperandio, 2012; Rasko et al., 2008) or dietary supplementation (zinc, biotin, acetylated starch feed) (Connolly et al., 2015; Fukuda et al., 2011; Mellies et al., 2012; Yang et al., 2015) are currently under consideration. Notably, LED209 blocks the binding of quorum sensing signaling molecules (AI-3, epinephrine and norepinephrine) to their receptor QseC, leading to the inhibition of QseC-mediated activation of virulence gene expression. LED209 has been shown to markedly inhibit EHEC virulence in vitro, but failed to decrease colonization in a rabbit animal model (Rasko & Sperandio, 2010).

Antagonistic effects of probiotics against EHEC pathogens

Beside these "abiotic" strategies, other approaches involving microorganisms have been considered, such as recombinant bacteria expressing surface molecules mimicking host cell receptors (Paton et al., 2000) or carrying vaccine proteins (Ahmed et al., 2014; Gu et al., 2011). Nevertheless, exposition of humans to genetically modified microorganisms leads to regulatory concerns (Paton et al., 2015). One of the most promising alternative strategies using microorganisms in the battle against EHEC infections is the use of probiotics. According to the popularized definition by the Food Agriculture Organization/World and Health Organization (FAO/WHO, 2002), and as revisited by an expert panel from the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (Hill et al., 2014), probiotics are defined as "Live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host". The most common probiotics include representatives of the lactic acid bacterial group (lactobacilli, enterococci, bifidobacteria) and yeasts from Saccharomyces genus (McFarland, 2015; Varankovich et al., 2015). The antagonistic effects of probiotics against enteric pathogens have been studied extensively and three general classes of anti-pathogenic mechanisms have been proposed: direct antagonism, immunomodulation and competitive exclusion (Preidis et al., 2011). Herein, this review outlines the beneficial effects of probiotic bacteria and yeast against EHEC pathogens for each mechanism listed above. These studies are summarized in Tables 1 (direct antagonism), 2 (immunomodulation) and 3 (competitive exclusion).

Direct antagonism

In direct antagonism, probiotics kill or inhibit the growth of pathogens to limit the spread of the infection or down-regulate the expression of virulence factors such as toxins or adhesins.

Clostridium butyricum, Escherichia coli Nissle and lactobacilli strains have been shown to inhibit EHEC growth in a simple in vitro approach using co-culture of probiotic and pathogen (Mohsin et al., 2015; Reissbrodt et al., 2009; Spinler et al., 2008; Takahashi et al., 2004) as well as in gnotobiotic mice (Eaton et al., 2011; Takahashi et al., 2004). In a dynamic multi-compartmental digestion system that closely mimics the physico-chemical conditions found in the human upper gastrointestinal tract (TNO gastroIntestinal Model; TIM), Saccharomyces cerevisiae significantly reduced EHEC O157:H7 growth observed in the distal parts of the small intestine, possibly through a potential inhibitory role of ethanol produced by the yeasts that could be lethal to bacteria by disrupting cell membrane (Etienne-Mesmin et al., 2011b). Other compounds with antibacterial activity have been identified, such as reuterin produced by Lactobacillus reuteri during glycerol fermentation (Spinler et al., 2008), butyric acid produced by C. butyricum (Takahashi et al., 2004) and lactic acid produced by lactic acid bacteria (Ogawa et al., 2001b). Bactericidal

activity of organic acids such as lactic acid depends mainly on their undissociated form than can permeate cell membranes by diffusion and release protons in the cell (Ogawa et al., 2001b). Such undissociated forms can be found in the human digestive environment at intestinal pH around 6 (Salminen & Wrigh, 2004). These antimicrobials can act alone or synergistically (Spinler et al., 2008). Interestingly, in germ-free mice monocolonized with EHEC, *L. reuteri* suppressed both the colonization of the pathogen and signs of disease in the animal, independently of reuterin production (Eaton et al., 2011).

There are also evidences that co-administration of EHEC and probiotics such as E. coli Nissle, C. butyricum or various strains of lactobacilli and bifidobacteria can lead to a decrease in Stx expression, production or activity in vitro (Carey et al., 2008; Medellin-Peña et al., 2007; Mohsin et al., 2015; Reissbrodt et al., 2009; Rund et al., 2013; Tahamtan et al., 2011; Takahashi et al., 2004) and in gnotobiotic or streptomycin-treated mice (Asahara et al., 2004; Takahashi et al., 2004; Yoshimura et al., 2010). Stx down-regulation may be related to pH decrease as a result of organic acids produced by probiotic bacteria (Asahara et al., 2004; Carey et al., 2008; Takahashi et al., 2004). Furthermore, in a dynamic model of the human large intestine, a probiotic strain of S. cerevisiae significantly reduced stx1 and stx2 expression, but the associated mechanisms are not yet elucidated (Thévenot et al., 2015). The probiotics can also exert their antagonistic effects on adhesin expression. Released exopolysaccharides from Lactobacillus acidophilus repressed biofilm formation by affecting EHEC genes related to curli production (Kim et al., 2009). Lactobacillus sakei and L. acidophilus exhibited in vitro a significant inhibitory effect on LEE expression in EHEC by the inhibition of AI-2 quorum signaling system, leading to a reduction of bacterial adhesion to Hep-2 cells (Medellin-Peña et al., 2007; Park et al., 2014).

Immunomodulation

Probiotics can interact with the host immune system and affect both innate and/or adaptive immunity. In mouse or rabbit models, Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium thermacidophilum enhanced the local immune response against EHEC and Stx and/or increased the cellular immune response, but to date the mechanisms involved remain unknown (Gagnon et al., 2006; Ogawa et al., 2001a; Shu & Gill, 2002). Probiotics may also modulate the EHEC-induced immune response through downregulation of pro-inflammatory cytokine expression. In vitro, Saccharomyces boulardii and Bifidobacterium

Table 1. Overview of the	reported studies showing ants	agonistic effects of probiotics agai	nst EHEC through dired	ct antagonism.		
References	Probiotic strains	EHEC strains	Dose (CFU/mL) Probiotic/EHEC	Model	Therapy	Mechanisms
Inhibition of EHEC growth Mohsin et al. (2015)	<i>E. coli</i> strain Nissle 1917	0157:H7 strain EDL933	$2 imes 10^3/2 imes 10^3$	<i>In vitro</i> coculture	Curative	Unknown mechanisms
Reissbrodt et al. (2009)	E. coli strain Nissle 1917	0104:H4 strain KKI II-2027 0157:H7 strains 97-10085 and FDI 933	Ratio 1:1	<i>In vitro</i> coculture	Curative	Unknown mechanisms
		ONT:H18 strain 97-14606, O103:H2 strain 97-16152, O8:H strain 97-04951, O26:H11 strain 03- 03231, 091:H ⁻ strain 03-06891				
Eaton et al. (2011)	L. reuteri (ATCC PTA 6475)	0157:H7 strain 86-24	$2 imes 10^8/1 imes 10^6$	<i>In vivo</i> germ-free Swiss- Webster mice	Preventive	Unknown but not associated with reuterin production
Etienne-Mesmin et al. (2011)	<i>S. cerevisiae</i> strain CNCM I- 3856	0157:H7 strain EDL933	$1 imes 10^7/2.5 imes 10^5$	<i>In vitro</i> digestion in the TIM-1 system	Curative	Unknown. Antimicrobial activ- ity of ethanol produced by veast?
Spinler et al. (2008)	L. reuteri (ATCC 55730, ATCC PTA 6475, ATCC PTA 4659 and ATCC PTA 5289)	Clinical isolates	$1 \times 10^7/1 \times 10^6$	In vitro agar spot method	Curative	Antibacterial activity of reu- terin produced during gly- cerol fermentation
Takahashi et al. (2004)	C. butyricum MIYAIRI strain 588	0157:H7 (clinically isolated) strains 6, 20 and 120	$1 \times 10^5/1 \times 10^3$	<i>In vivo</i> gnotobiotic IQI/jic mice	Curative	Bactericidal activity of organic acids associated with a pH decrease
Ogawa et al. (2001)	L. casei strain SHIROTA L. acidophilus strain YIT 0070	0157:H7 (isolated from patients) strains Okayama, Yokohama and 89020087	$1 \times 10^{9}/1 \times 10^{7}$	<i>In vitro</i> coculture	Curative	Bactericidal activity of organic acids associated with a pH decrease
Down-regulation of virulence for	actors					
Thévenot et al. (2015)	S. cerevisiae strain CNCM I- 3856	0157:H7 strain EDL933	$1 \times 10^{7\prime} 1 \times 10^7$	<i>In vitro</i> fermentation in the ARCOL model	Preventive	Decrease of stx mRNA levels by unknown mechanisms
Mohsin et al. (2015)	E. coli strain Nissle 1917	O157:H7 strain EDL933, O104:H4 strain RKI II-2027	$2 imes 10^3/2 imes 10^3$	In vitro coculture	Curative	Decrease of Stx2 production by unknown mechanisms
Rund et al. (2013)	<i>E. coli</i> strain Nissle 1917	0157:H7 strain EDL933, 0104:H4 strain TY3730, 0104:H4 strain TY3456	$1.5 imes 10^8/1.5 imes 10^7$	<i>In vitro</i> coculture	Curative	Decrease of 5tx2 production by unknown mechanisms
Reissbrodt et al. (2009)	<i>E. coli</i> strain Nissle 1917	0157:H7 strains 97-10085 and EDL933, ONT:H18 strain 97- 14606, 0103:H2 strain 97- 16152, 08:H7 strain 97-04951, 026:H11 strain 03-05831, 091:H1 strain 03-06891	Ratio 1:1	<i>In vitro</i> coculture	Curative	Decrease of 5tx2 production by unknown mechanisms
Park et al. (2014)	L. sakei strain NR28	0157:H7 strain EDL932	$OV/1 imes 10^{6}$	<i>In vitro</i> coculture	Curative	Reduction of EHEC virulence
Tahamtan et al. (2011)	B. lactis	0157:H7 strain EDL933	$1 \times 10^{5}/1 \times 10^{4}$	In vitro Vero cells assay	Preventive	by inhibition of AI-2 Decrease of Stx2/Gb3 interac- tions due to secreted sol-
Kim et al. (2001)	B. longum strain HY8001	0157:H7 strain EDL932	I	In vitro Vero cells assay	Preventive	upre substances Decrease of Stx2/Gb3 interac- tions due to secreted sol-
Yoshimura et al. (2010)	<i>B. infantis</i> strain 157F and <i>B. longum</i> strain NS	0157:H7 strain 44 ^{Rf}	$2 \times 10^{-8}/2 \times 10^{-4}$	<i>In vivo</i> gnotobiotic BALB/c mice	Preventive	uple substances Diminution of Stx concentra- tions in the cecal contents by unknown mechanisms
						(continued)

CRITICAL REVIEWS IN MICROBIOLOGY 🕥 121

0
ດັນ
=
=
·:=
<u> </u>
~
.0
\circ
-
e 1.
le 1.
ble 1.
able 1.
Table 1.

References	Probiotic strains	EHEC strains	Dose (CFU/mL) Probiotic/EHEC	Model	Therapy	Mechanisms
Kim et al. (2009)	L. acidophilus strain A4	0157:H7 strain EDL933	$OV/1 imes 10^{6}$	In vitro coculture	Curative	Inhibition of biofilm formation by repression of related genes expression
Carey et al. (2008)	 L. rhamnosus strain GG (ATCC 53103), L. curvatus (FRP 15), L. plantarum (FRP 16), L. jensenii (ATCC 25238), L. acidophilus (FRP 728), L. acidophilus (FRP 737), L. reuteri (ATCC 23272), P. acidilactici (ATCC 8081), P. cerevisiae (FRP 240), P. pentosaceus (FRP 243), B. thermophilum (ATCC 25525), B. boum (ATCC 25525), and D. acidot. (27533) and D. acidot. (2753) and D. acidot. (27533) and D. acidot. (2753) and D. acidot. (2755) and D. acidot. (2755) and D. aci	0157:H7 strain EDL933	Ratio 1:1	In vitro coculture	Curative	Down regulation of <i>stx2</i> expression associated with organic acid production and pH decrease
Takahashi et al. (2004)	b. animuus (x 19) C. butyricum MIYAIRI strain 588	O157:H7 (clinically isolated) strains 6, 20 and 120	$1 \times 10^{5}/1 \times 10^{3}$	<i>In vivo</i> gnotobiotic IQI/jic mice	Curative	Down regulation of <i>stx2</i> expression associated with organic acid production and
Asahara et al. (2004)	B. breve strain Yakult	0157:H7 (clinically isolated) strain 89020087	$1 imes 10^9/5 imes 10^4$	In vivo streptomycin- treated BALB/c mice	Preventive	pn decrease Down regulation of <i>stx2</i> expression associated with organic acid production and DH decrease
Medellin-Peña et al. (2007)	L. acidophilus strain La-5	0157:H7 strains CDC B6914-MS1, EDL932	$1 \times 10^8/1 \times 10^7$	<i>In vitro</i> coculture	Curative	AI-2 activity and LEE genes expression decreased by <i>L. acidophilus</i> -secreted molecules

"Curative" treatment: co-administration of probiotics with the pathogen or co-culture of pathogen and probiotics "Preventive" treatment: probiotics were administered prior to the pathogen. B: Bifidobacterium; C:: Clostridium; E:: Escherichia; L:: Lactobacillus; S:: Saccharomyces; Al-2: Autoinducer 2; ARCOL: Artificial COLon; Gb3: globotriosyl ceramide 3; LEE: Locus of enterocyte effacement; TIM: TNO gastro-intestinal Model; OY: overnight culture.

122 😧 C. CORDONNIER ET AL.

breve reduced IL-8 secretion during EHEC infection of intestinal cells via the inhibition of the NF-κB (nuclear factor-kappa B) signaling pathway (Dahan et al., 2003; Stöber et al., 2010). *Saccharomyces boulardii* can also down-regulate TNF- α synthesis and related apoptosis in EHEC-infected intestinal epithelial T-84 cells (Dalmasso et al., 2006). These *in vitro* results were strengthened by *in vivo* studies in EHEC-infected mice where *Lactobacillus paracasei* inhibited inflammation by down-regulating the expression of the pro-inflammatory cyto-kines IL-1 β and IL-6 and of Toll-like receptors (TLR) on macrophages (Tsai et al., 2010).

Exclusion

Through exclusion mechanism, probiotics can alter the microenvironment to prevent pathogens such as EHEC from gaining access to their appropriate receptors, to limit their attachment, entry or translocation or to improve intestinal barrier function.

Most studies have shown that probiotic strains from Lactobacillus genus can limit EHEC adhesion to intestinal epithelial cells in vitro and reduce the formation of A/E lesions (Arena et al., 2014; Chen et al., 2007; Hugo et al., 2008; Medellin-Peña & Griffiths, 2009; Sherman et al., 2005; Turková et al., 2013). Surface layer proteins of Lactobacillus crispatus were shown to contribute to its increased adhesion to the cultured cells and therefore competitive exclusion of EHEC pathogens (Chen et al., 2007). Antagonistic effect of Lactobacillus may also result from small molecules secreted by the probiotic as L. acidophilus cell-free spent medium remains active against EHEC attachment to the intestinal epithelial cells of ICR mice (Medellin-Peña & Griffiths, 2009). Inhibition of pathogen adherence to intestinal epithelial cells may also result from physical interactions between probiotics and EHEC, as it has already been shown for S. boulardii (Gedek, 1999), or from the ability of probiotics to increase intestinal mucin gene expression. Kim et al. (2008) and Mack et al. (1999) have shown that selected lactobacilli are able to induce the upregulation of MUC2 and MUC3 intestinal mucins, thereby inhibiting the attachment of E. coli O157:H7 to epithelial cells in vitro.

In addition to anti-adhesive properties, scarce studies have demonstrated that probiotics can limit EHEC internalization and translocation. Among the four *Lactobacillus* strains tested, only *L. rhamnosus* suppressed the internalization of EHEC by human colon epithelial cells (Hirano et al., 2003). Besides, in murine ileal loops, *S. cerevisiae* specifically inhibited EHEC interactions with Peyer's patches and the subsequent hemorrhagic lesions (Thévenot et al., 2015). Lastly, *L. rhamnosus*-fed mice exhibited a lower incidence of EHEC translocation to extra-intestinal tissues, including spleen and liver (Shu & Gill, 2002).

Probiotics may also act favorably on the integrity of the intestinal barrier. In T84 cells, S. boulardii increased the transepithelial electrical resistance (TEER) by maintaining the structural proteins of cytoskeleton via inhibition of the phosphorylation of myosin light chain (Dahan et al., 2003). Likewise, Bifidobacterium lactis and L. rhamnosus synthetize molecules that stabilize tight junctions by inhibiting cytoskeletal rearrangement induced by EHEC (Johnson-Henry et al., 2008; Putaala et al., 2008). In gnotobiotic mice, Bifidobacterium Iongum prevented Stx translocation through the intestinal epithelium without changing EHEC growth rate or virulence gene expression (Fukuda et al., 2011) and inhibited their interactions with Gb3 receptor (Kim et al., 2001). The authors suggested that acetate produced by bifidobacteria may act on the colonic epithelium to enhance epithelial integrity and the anti-apoptotic or anti-inflammatory responses, resulting in blocking the infiltration of lethal amounts of Stx from the gut lumen into the bloodstream (Fukuda et al., 2012, 2011).

Despite the prominent role of gut microbiota in probiotic activity, only two studies have investigated the effect of probiotics on human gut microbiota composition and activity in a context of EHEC infection. In a human large intestinal model inoculated with EHEC O157:H7, the probiotic yeast S. cerevisiae had an individual-dependent effect on the main population of intestinal microbiota and favorably influenced aut microbiota metabolic activity through modulation of short-chain fatty acid (SCFA) production, increasing acetate production and decreasing that of butyrate (Thévenot et al., 2015, 2013). As mentioned above, acetate has an anti-infectious activity against EHEC through the inhibition of Stx translocation (Fukuda et al., 2011), while butyrate has been shown to enhance the expression of LEE and mobility genes of the pathogen (Nakanishi et al., 2009; Tobe et al., 2011). Currently, there is no evidence to state that such modulation of SCFA production by probiotics will be significant enough in the gut microbial ecosystem to induce inhibitory effects on EHEC. In their study, Thévenot et al. (2015) have observed a significant reduction in stx expression, but the underlying mechanisms are still unknown and such inhibitory effect has not been specifically linked to changes in SCFA production.

Probiotic-based strategy: potential and limits

A significant number of studies have shown the beneficial effects of probiotic bacteria or yeast on EHEC pathogens through direct antagonism, interaction with host immune response or competitive exclusion. Probiotics may use a combination of these mechanisms, opening up the opportunity for a multi-targeted approach, more relevant than a single one due to the complexity of EHEC pathogenesis. Nevertheless, most of the current studies have been carried out using oversimplified in vitro approaches (such as co-cultures of probiotic and pathogen), intestinal cells in culture or in vivo germ-free or antibiotic treated animals. To date, only three studies have been conducted in human-simulated digestive environment using dynamic in vitro models of the upper and lower digestive tract (Etienne-Mesmin et al., 2011b; Thévenot et al., 2015, 2013). Despite the interest of all these approaches, the conditions reproduced can differ markedly from the ones encountered in the human gastro-intestinal tract. A protective mucus layer is missing in most cell culture models and in vitro models do not include some essential environmental cues, such as host immune effectors and hormones or quorum sensing. In vivo models are hampered by speciesspecific differences in Gb3 distribution and by the lack or the alteration of natural intestinal microbiota (Ritchie, 2014). In any case, the results obtained in vitro (even in advanced models) or in animal models cannot directly be extrapolated to the human situation and clinical trials still remain a distant prospect.

Mechanisms mediating beneficial effects of probiotics in EHEC infections (Figure 3) mainly involve production of antimicrobial compounds such as reuterin or organic acids that could inhibit pathogen growth or down-regulate virulence gene expression (Carey et al., 2008; Spinler et al., 2008; Takahashi et al., 2004). However, in the majority of cases, studies showing beneficial effects of probiotics remain merely descriptive and additional efforts have to be made to unravel the associated mechanisms of action. In particular, even if it is generally acknowledged that probiotics act through beneficial modulation of the gut microbial ecosystem (Hemarajata & Versalovic, 2013), only two studies have investigated the effect of probiotic strains in the presence of human intestinal microbiota (Thévenot et al., 2015, 2013). Broadly, data on the interactions of EHEC with human gut microbiota remain very scarce and controversial (Pifer & Sperandio, 2014). De Sablet et al., (2009) and Iversen et al., (2015) have shown that Bacteroides thetaiotaomicron, a predominant commensal gut bacterium, is able to inhibit Stx2 synthesis. On the contrary, Pacheco et al. (2012) and Curtis et al., (2014) have demonstrated that the same bacteria contributes to EHEC virulence by cleaving fucose from mucin and by producing succinate that induces T3SS and Stx2 production.

To date, assumptions have been made about mechanisms of the action of probiotics, but in-depth investigations remain limited by EHEC pathogenicity, human studies being obviously inconceivable. Relevant alternatives may imply human microbiota-associated animals (Le Bihan et al., 2015) or digestion models closely mimicking the human digestive tract (Guerra et al., 2012; Payne et al., 2012). Humanized animal models are attractive tools to study the interplay between host, resident microbiota, probiotics and EHEC. Dynamic multi-compartmental in vitro digestion models, such as the TIM (Blanquet-Diot et al., 2012; Minekus et al., 1995) or the SHIME (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem) (Marzorati et al., 2014; Molly et al., 1993) may be useful to better understand how probiotics and EHEC interact in the successive environments of the human gastrointestinal tract and respond to main physicochemical digestive parameters (such as acid stress, bile, oxygen level or fluid shear) in a tempora-I-spatial fashion.

Probiotics in a global health area

Once the health benefit of probiotics is being established using in vitro and in vivo approaches, the next questions to be addressed will be how and when the probiotics should be taken? Probiotic dosage depends on both products and specific indications. Generally, no consensus exists about the minimum number of microorganisms that must be ingested to obtain a beneficial effect, but the concentration of probiotics needed to obtain clinical effects is often quoted as >10⁶ CFU/mL in the small bowel and 10⁸ CFU/g in the colon (Minelli & Benini, 2008). In studies investigating the antagonistic effects of probiotics against EHEC strains, probiotic concentrations varied from 10³ to 10⁹ CFU/mL with a ratio between probiotic and pathogen ranging from 1 to 10^4 – 10^5 . However, it is difficult to extrapolate these data to humans and only clinical trials will allow the determination of effective doses. In studies related in Tables 1-3, both preventive and curative probioticbased strategies have been successfully used in the fight against EHEC pathogens. In human, the most appropriated use of probiotics would certainly be to administer them to at-risk populations (young infant, elderly people) during EHEC outbreaks or sporadic cases, as a complement for the available symptomatic treatments. Another possibility would be to treat the immediate entourage of infected people with the aim to minimize or prevent secondary transmission. Alternatively, probiotics should also be given to patients suffering from aqueous diarrhea to prevent systemic complications before establishment of EHEC infection.



Figure 3. Antagonistic effects of probiotics against EHEC pathogens and cellular and molecular-associated mechanisms. Probiotics may exert their beneficial effects through three different mechanisms. In direct antagonism, the probiotics inhibit the growth of the pathogen or down-regulate expression of virulence genes encoding Shigatoxins or adhesins such as intimin. Through immunomodulation, probiotics interact with the host immune system and can affect both innate and/or adaptive immunity. In competitive exclusion, probiotics alter the microenvironment (including gut microbiota) to limit EHEC attachment, entry or translocation through intestinal epithelium or to improve epithelial barrier function.

Table 2. Overview of	f reported studies	showing antage	onistic effects of	probiotics agains	t FHFC through	immunomodulation
Tuble III Offerfield of	i reportea staates	showing unlug.	ornstre encets or	problotics agains	c Enice through	minutionitoudulation

			Dose (CFU/mL)			
References	Probiotic strains	EHEC strains	Probiotic/EHEC	Model	Therapy	Mechanisms
Enhance the functionality	ry of innate and/or adapt	ive immunity	0 10			
Gagnon et al. (2006)	B. thermacidophilum strain RBL 71	O157:H7 strain EDL931	4 × 10 ⁹ /2 × 10 ¹⁰	<i>In vivo</i> infection in BALB/c mice	Preventive	Increased levels of anti- <i>E. coli</i> 0157:H7-specific IgA in feces and IgG and IgM in serum
Shu and Gill (2002)	<i>L. rhamnosus</i> strain HN001	O157:H7 strain 2988	Supplemented diet 3×10^8 CFU/g $/4 \times 10^3$	<i>In vivo</i> infection in BALB/c and C57BL/6 mice	Preventive	Increased levels of anti- <i>E. coli</i> O157:H7 IgAs
Ogawa et al. (2001b)	L. casei strain Shirota	O157:H7 strain 89020087	$1\times 10^8/4\times 10^3$	Infant rabbit infection model	Preventive	Increased levels of anti-Stx1/Stx2 lgAs
Limit the ability of the p	athogen to initiate or fa	cilitate an immune respon	se			
Tsai et al. (2010)	<i>L. paracasei</i> strain NTU 101	O157:H7 strain EDL933	$1\times 10^8/5\times 10^4$	<i>In vivo</i> infection in BALB/c mice	Preventive	Down-regulation of proinflamatory cytokines and che- mokines expression
Stöber et al. (2010)	<i>B. adolescentis</i> strain DSMZ 20086	O157:H7 strain EDL933, O103:H2 strain PMK5, O26:H ⁻ strain 2331/01, O157:H ⁻ strain 5791/ 99, O113:H21 strain TS 18/08	Ration 100:1	<i>In vitro</i> infection in HT29 cells	Curative	Inhibition of IL-8 secretion by block- ing the NF-κB sig- naling pathway
Dahan et al. (2003)	S. boulardii (BIOCODEX)	O157:H7 strain EDL931	Ratio 1:10	<i>In vitro</i> infection in T84 cells	Preventive	Inhibition of IL-8 secretion by block- ing the NF-κB sig- naling pathway
Dalmasso et al. (2006)	S. <i>boulardii</i> (BIOCODEX)	O157:H7 strain EDL931	Ratio 1:10	<i>In vitro</i> infection in T84 cells	Preventive	Inhibition of TNF-α synthesis and related apoptosis

"Curative" treatment: co-administration of probiotics with the pathogen or co-culture of pathogen and probiotics. "Preventive" treatment: probiotics were administered prior to the pathogen.

B.: Bifidobacterium; L.: Lactobacillus; S.: Saccharomyces; IL: Interleukin; NF-κB: Nuclear Factor-Kappa B; TNF: Tumor Necrosis Factor.

Probiotics are available as supplements (i.e., tablets, capsules or powders) and fermented dairy products (i.e., yogurt and milk) (Foligné et al., 2013). With regards to EHEC, no study has investigated the influence of dosage forms on the antagonistic properties of probiotics and very few surveys have assessed their activity when being administered within a food vehicle (Arena et al., 2014; Russo et al., 2014), leaving a wide field of investigation. In particular, it would be of great interest to evaluate how the mode of administration may influence the antagonistic activity of probiotics against EHEC strains in the human digestive environment. Depending on the intended use of a probiotic, i.e. whether as a drug or a dietary supplement, regulatory requirements will differ (Hoffmann, 2013; Venugopalan et al., 2010). The most likely scenario for probiotics in the treatment of EHEC infections is their commercialization as a drug which will impose sound demonstration of safety and efficacy for beneficial microorganisms.

Even if probiotics are well-recognized for their health beneficial effects in human, probiotic therapy can be contraindicated, mainly in critically ill patients, critically sick infants, postoperative as well as in hospitalized and immune-compromised patients (Didari et al., 2014; Snydman, 2008). The main identified risk factors are immune compromised state, impaired intestinal barrier function associated with multi organ failure or severe acute pancreatitis, and central venous catheter (Sanders et al., 2010). The main area of concern with probiotic use is the risk of sepsis, possible adverse metabolic effects from manipulation of the microbiota and transfer of antimicrobial resistance from probiotic strain to more pathogenic bacteria from the resident microbiota. As EHEC belong to a family of pathogens which causes A/E lesions, infection leads to injury of the epithelial cell barrier, which has been identified as a risk factor for probiotic adverse effects. Therefore, it can be reasonably argued that probiotics have to be used with greatest caution in severely ill patients (especially young infant), such as during acute phase of HUS.

This review primarily focuses on the interest of a probiotic-based strategy in human. Nevertheless, it should be pointed out that such approach could also be used at different stages of the food chain from agricultural

Table 3. Overview of	reported studies showir	ng antagonistic effect:	s of probiotics agains	st EHEC through competitive	exclusion.	
References	Probiotic strains	EHEC strains	Dose (CFU/mL) Probiotic/EHEC	Model	Therapy	Mechanisms
Limit EHEC attachment, en Thévenot et al. (2015)	try or translocation 5. cerevisiae strain CNCM 1-3856	0157:H7 strain EDL933	$1 \times 10^{7} / 1 \times 10^{7}$	<i>In vivo</i> murine ileal loops model	Preventive	Inhibition of EHEC interactions with Peyer's patches
Arena et al. (2014)	L. plantarum strain CECT 8328 L. fermentum strain CECT 8448	0157:H7 strain CECT 409	$8 imes 10^8/8 imes 10^8$	<i>In vitro</i> infection in Caco-2 cells	Curative	Inhibition of EHEC adhesion by unknown mechanisms
Turková et al. (2013)	L. gasseri strain CCDM 215, L. acidophilus strain CCDM 149, L. helveticus strain CCDM 82	0157:H7 (clinical isolate)	1	<i>In vitro</i> infection in Caco-2 cells	Curative	Inhibition of EHEC adhesion by unknown mechanisms
Hugo et al. (2008)	L. lactis strain CIDCA133 L. plantarum strain CIDCA 83114	0157:H7 (clinical iso- late 69160)	$1 imes 10^8/1 imes 10^6$	<i>In vitro</i> infection in Hep-2 cells	Preventive	Inhibition of EHEC adhesion by unknown mechanisms
Sherman et al. (2005)	L. acidophilus strain R0052	0157:H7 strain CL-56	$5 imes 10^9/5 imes 10^9$	<i>In vitro</i> infection in T84 cells	Preventive	Inhibition of EHEC adhesion by unknown mechanisms
Mellin-Peña and Griffiths	L. acidophilus strain La-5	0157:H7 strains VS94, 43894	$1.2 imes 10^8 / 1 imes 10^5$	<i>In vitro</i> infection in Hen-2 cells	Curative	Inhibition of EHEC adhesion by small secreted
Chen et al. (2007)	L. crispatus strain ZJ001	0157:H7 strain CDC R1409-C1	$1 \times 10^7/1 \times 10^7$	<i>In vitro</i> infection in Hela cells	Curative	Competitive exclusion of pathogens during adhesion to intertinal enithelial cells
Hirano et al. (2003)	L. rhamnosus (ATCC 53103), L. gasseri strain DSM 20243,	0157:H7 strain RIND 0509890	$1 \times 10^9/5 \times 10^5$	In vitro infection in Caco-2 cells	Curative	Suppression of EHEC internalization in human colon epithelial cells by unknown mechanisms
	plantarum (ATCC), L.					
Shu and Gill (2002)	L. rhamnosus strain HN001	0157:H7 strain 2988	Supplemented diet 3×10^8 CFU/g $/4 \times 10^3$	<i>In vivo</i> infection in BALB/c and C57BL/6 mice	Preventive	Inhibition of EHEC translocation to extra-intes- tinal tissues by unknown mechanisms
Increase of intestinal barri Fukuda et al. (2011)	r function B. longum strain JCM 1217 ^T	0157:H7 strain 44 ^{Rf}	ı	<i>In vivo</i> germ-free BALB/c mice	Preventive	Inhibition of Stx translocation through the intestinal epithelium by enhancing epithelial integrity and the anti- apoptotic responses
Johnson-Henry et al.	L. rhamnosus strain GG	0157:H7 strain CL56	$1\times 10^8/1\times 10^7$	<i>In vitro</i> infection in MDCK-I and T84 cells	Curative	via acetate production Tight-junction integrity preserved by secreted molecules
Putaala et al. (2008)	B. lactis strain 420	0157:H7 (non-refer- enced strain)	I	<i>In vitro</i> infection in Caro-7 cells	Preventive	Tight-junction integrity preserved by secreted molecules
Kim et al. (2008)	L. acidophilus strains A4, 30SC, 107A, 606, L. rhamnosus strain GG (ATCC 53103)	0157:H7 strains 4389, 43894	$1 imes 10^9/1 imes 10^6$	<i>In vitro</i> infection in HT-29 cells	Curative and Preventive	Inhibition of EHEC adherence to intestinal epi- thelial cells by increasing expression of mucin genes
Mack et al. (1999)	L. thermosous strain GG (ATCC 53103), L. plantarum strain 299v	0157:H7 strain CL8	1×10^9 UFC/well /1 $\times 10^5$ UFC/well	<i>In vitro</i> infection in HT-29 and Hep-2 cells	Curative and Preventive	Inhibition of EHEC adherence to intestinal epi- thelial cells by increasing expression of mucin genes (continued)
						(LUITINIUGU)

CRITICAL REVIEWS IN MICROBIOLOGY 🕥 127

Table 3. Continued						
References	Probiotic strains	EHEC strains	Dose (CFU/mL) Probiotic/EHEC	Model	Therapy	Mechanisms
Dahan et al. (2003)	S. boulardii (BIOCODEX)	0157:H7 strain EDL931	Ratio 1:10	<i>In vitro</i> infection in T84 cells	Preventive	Increase in trans-monolayer electrical resist- ance (TEER) through maintenance of cytoskeleton structural proteins
Modulation of gut microt Thévenot et al. (2015)	iota 5. cerevisiae strain CNCM 1-3856	0157:H7 strain EDL933	$1 \times 10^7/1 \times 10^7$	<i>In vitro</i> fermentation in the ARCOL model	Preventive	Modulation of human gut microbiota activity in a favorable way: increase in acetate pro- duction (inhibitor of Stx production) and
Thévenot et al. (2013)	<i>S. cerevisiae</i> strain CNCM I-3856	0157:H7 strain EDL933	$1 imes 10^7/1 imes 10^5$	In vitro fermentation in the ARCOL model	Curative	or LEE expression) of LEE expression) Modulation of human gut microbiota activity in a favorable way: increase in acetate pro- duction (inhibitor of Stx production) and
						decrease in butyrate production (enhancer of LEE expression)
"Curative" treatment: co-	administration of probiotics w	vith the pathogen or co-	culture of pathogen and	probiotics. "Preventive" treatment:	probiotics were administ	ered prior to the pathogen.

production on the farm to processing and manufacturing of foods. In agricultural production, probiotics can act at two levels to control EHEC infection: (i) in animal feed to reduce EHEC carriage in the ruminant gastrointestinal tract, thus limiting contamination of foodrelated products (Berry & Wells, 2010; Forano et al., 2013) and (ii) as silage inoculants to prevent microbial spoilage (Duniere et al., 2015; Dunière et al., 2011; Pedroso et al., 2010). Probiotic supplementation has also been considered during processing of various food matrices (dairy products, sausages and olives) to reduce EHEC bacterial load (Bevilacqua et al., 2010; Calderón et al., 2007; Ruiz-Moyano et al., 2009).

Conclusions

EHEC have been recognized as one of the most important water and food-borne pathogens. As current treatment of EHEC infections is essentially symptomatic, alternative therapeutic options, such as the use of probiotic microorganisms, have been considered in an attempt at decreasing infection outcomes. A significant number of *in vitro* and *in vivo* studies have shown the beneficial effects of probiotics against the pathogen. However, in-depth understanding of the underlying cellular and molecular mechanisms and clear definition of appropriate conditions of probiotic use in humans (dose, mode of administration, potential adverse effects) are challenging, but necessary steps should be taken before their commercialization and use in EHEC-infected patients.

Disclosure statement

The authors report that they have no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

References

Bifidobacterium; L.: Lactobacillus; S.: Saccharomyces

В.:

- Ahmed B, Loos M, Vanrompay D, Cox E. (2014). Oral immunization with *Lactococcus lactis*-expressing EspB induces protective immune responses against *Escherichia coli* 0157:H7 in a murine model of colonization. Vaccine 32:3909–16.
- Alsharif G, Ahmad S, Islam MS, et al. (2015). Host attachment and fluid shear are integrated into a mechanical signal regulating virulence in *Escherichia coli* O157:H7. Proc Natl Acad Sci USA 112:5503–8.
- Arena MP, Russo P, Capozzi V, et al. (2014). Probiotic abilities of riboflavin-overproducing *Lactobacillus* strains: a novel promising application of probiotics. Appl Microbiol Biotechnol 98:7569–81.
- Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, et al. (2004). Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga

toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun 72:2240–7.

- Barnett Foster D. (2013). Modulation of the enterohemorrhagic *E. coli* virulence program through the human gastrointestinal tract. Virulence 4:315–23.
- Bauwens A, Betz J, Meisen I, et al. (2013). Facing glycosphingolipid–Shiga toxin interaction: dire straits for endothelial cells of the human vasculature. Cell Mol Life Sci 70:425–57.
- Bergan J, Dyve Lingelem AB, Simm R, et al. (2012). Shiga toxins. Toxicon 60:1085–107.
- Berry ED, Wells JE. (2010). Escherichia coli O157:H7: recent advances in research on occurrence, transmission, and control in cattle and the production environment. Adv Food Nutr Res 60:67–117.
- Bevilacqua A, Altieri C, Corbo MR, et al. (2010). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian Bella di Cerignola table olives: selection of potential multifunctional starter cultures. J Food Sci 75:M536–44.
- Blanquet-Diot S, Denis S, Chalancon S, et al. (2012). Use of artificial digestive systems to investigate the biopharmaceutical factors influencing the survival of probiotic yeast during gastrointestinal transit in humans. Pharm Res 29:1444–53.
- Branchu P, Matrat S, Vareille M, et al. (2014). NsrR, GadE, and GadX interplay in repressing expression of the *Escherichia coli* O157:H7 LEE pathogenicity island in response to nitric oxide. PLoS Pathog 10:e1003874.
- Bryan A, Youngster I, McAdam AJ. (2015). Shiga toxin producing *Escherichia coli*. Clin Lab Med 35:247–72.
- Calderón O, Padilla C, Chaves C, et al. (2007). [Evaluation of the effect of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic culture added to yogurt over *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* populations]. Arch Latinoam Nutr 57:51–5.
- Carey CM, Kostrzynska M, Ojha S, Thompson S. (2008). The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J Microbiol Methods 73:125–32.
- Chen X, Xu J, Shuai J, et al. (2007). The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. Int J Food Microbiol 115:307–12.
- Chong Y, Fitzhenry R, Heuschkel R, et al. (2007). Human intestinal tissue tropism in *Escherichia coli* O157: H7–initial colonization of terminal ileum and Peyer's patches and minimal colonic adhesion ex vivo. Microbiol (Read Engl) 153:794–802.
- Connolly JPR, Finlay BB, Roe AJ. (2015). From ingestion to colonization: the influence of the host environment on regulation of the LEE encoded type III secretion system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Front Microbiol 6:568. doi:10.3389/fmicb.2015.00568.
- Curtis MM, Hu Z, Klimko C, et al. (2014). The gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* exacerbates enteric infection through modification of the metabolic landscape. Cell Host Microbe 16:759–69.
- Dahan S, Dalmasso G, Imbert V, et al. (2003). *Saccharomyces boulardii* interferes with enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced signaling pathways in T84 cells. Infect Immun 71:766–73.

- Dalmasso G, Loubat A, Dahan S, et al. (2006). *Saccharomyces boulardii* prevents TNF-alpha-induced apoptosis in EHEC-infected T84 cells. Res Microbiol 157:456–65.
- de Sablet T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, et al. (2009). Human microbiota-secreted factors inhibit Shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun 77:783–90.
- Didari T, Solki S, Mozaffari S, et al. (2014). A systematic review of the safety of probiotics. Expert Opin Drug Saf 13:227–39.
- Dunière L, Gleizal A, Chaucheyras-Durand F, et al. (2011). Fate of *Escherichia coli* O26 in corn silage experimentally contaminated at ensiling, at silo opening, or after aerobic exposure, and protective effect of various bacterial inoculants. Appl Environ Microbiol 77:8696–704.
- Duniere L, Jin L, Smiley B, et al. (2015). Impact of adding Saccharomyces strains on fermentation, aerobic stability, nutritive value, and select lactobacilli populations in corn silage. J Anim Sci 93:2322–35.
- Eaton KA, Honkala A, Auchtung TA, Britton RA. (2011). Probiotic *Lactobacillus reuteri* ameliorates disease due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* in germfree mice. Infect Immun 79:185–91.
- Etienne-Mesmin L, Chassaing B, Sauvanet P, et al. (2011a). Interactions with M Cells and Macrophages as key steps in the pathogenesis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. PLoS One 6:e23594.
- Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Privat M, et al. (2011b). Effect of a new probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in a dynamic gastrointestinal model. Appl Environ Microbiol 77:1127–31.
- FAO/WHO. (2002). Report of a joint FAO/WHO working group on drafture Organization of the United Nations and World Health Organization. London, Ontario, Canada.
- Foligné B, Daniel C, Pot B. (2013). Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. Curr Opin Microbiol 16:284–92.
- Forano E, Chaucheyras-Durand F, Bertin Y, Martin C. (2013). [EHEC carriage in ruminants and probiotic effects]. Biol Aujourdhui, 207:261–7.
- Frank C, Werber D, Cramer JP, et al. HUS Investigation Team. (2011). Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. N Engl J Med 365:1771–80.
- Fukuda S, Toh H, Hase K, et al. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. Nature 469:543–7.
- Fukuda S, Toh H, Taylor TD, et al. (2012). Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. Gut Microbes 3:449–54.
- Gagnon M, Kheadr EE, Dabour N, et al. (2006). Effect of *Bifidobacterium thermacidophilum* probiotic feeding on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in BALB/c mice. Int J Food Microbiol 111:26–33.
- Garcia-Angulo VA, Kalita A, Torres AG. (2013). Advances in the development of enterohemorrhagic *Escherichia coli* vaccines using murine models of infection. Vaccine 31:3229–35.
- Gedek BR. (1999). Adherence of *Escherichia coli* serogroup O 157 and the *Salmonella typhimurium* mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. Mycoses 42:261–4.

- Goldwater PN, Bettelheim KA. (2012). Treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection and hemolytic uremic syndrome (HUS). BMC Med 10:12.
- Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, et al. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. Trends Biotechnol 30:591–600.
- Gu J, Ning Y, Wang H, et al. (2011). Vaccination of attenuated EIS-producing *Salmonella* induces protective immunity against enterohemorrhagic *Escherichia coli* in mice. Vaccine 29:7395–403.
- Hemarajata P, Versalovic J. (2013). Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. Therap Adv Gastroenterol 6:39–51.
- Hill C, Guarner F, Reid G, et al. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 11:506–14.
- Hirano J, Yoshida T, Sugiyama T, et al. (2003). The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro. Microbiol Immunol 47:405–9.
- Hoffmann DE. (2013). Health claim regulation of probiotics in the USA and the EU: is there a middle way? Benef Microbes 4:109–15.
- Hugo AA, Kakisu E, De Antoni GL, Pérez PF. (2008). Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic Escherichia coli in vitro. Lett Appl Microbiol 46:613–19.
- Iversen H, Lindbäck T, L'Abée-Lund TM, et al. (2015). The gut bacterium Bacteroides thetaiotaomicron influences the virulence potential of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O103:H25. PLoS One, 10:e0118140.
- Johnson-Henry KC, Donato KA, Shen-Tu G, et al. (2008). Lactobacillus rhamnosus strain GG prevents enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. Infect Immun 76:1340–8.
- Karpman D, Ståhl AL. (2014). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis and the host response. Microbiol Spectr 2. [Epub ahead of print]. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0009-2013.
- Keir LS. (2015). Shiga toxin associated hemolytic uremic syndrome. Hematol Oncol Clin North Am 29:525-39.
- Kimmitt PT, Harwood CR, Barer MR. (2000). Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. Emerging Infect Dis 6:458–65.
- Kim SH, Yang SJ, Koo HC, et al. (2001). Inhibitory activity of Bifidobacterium longum HY8001 against vero cytotoxin of Escherichia coli O157:H7. J Food Prot 64:1667–73.
- Kim Y, Kim SH, Whang KY, et al. (2008). Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 attachment by interactions between lactic acid bacteria and intestinal epithelial cells. J Microbiol Biotechnol 18:1278–85.
- Kim Y, Oh S, Kim SH. (2009). Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Biochem Biophys Res Commun 379:324–9.
- Lapeyraque AL, Malina M, Fremeaux-Bacchi V, et al. (2011). Eculizumab in severe Shiga-toxin-associated HUS. N Engl J Med 364:2561–3.

- Le Bihan G, Jubelin G, Garneau P, et al. (2015). Transcriptome analysis of *Escherichia coli* O157:H7 grown in vitro in the sterile-filtrated cecal content of human gut microbiota associated rats reveals an adaptive expression of metabolic and virulence genes. Microbes Infect Inst Pasteur 17:23–33.
- Lewis SB, Cook V, Tighe R, Schüller S. (2015). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* colonization of human colonic epithelium in vitro and ex vivo. Infect Immun 83:942–9. doi:10.1128/IAI.02928-14.
- MacConnachie AA, Todd WTA. (2004). Potential therapeutic agents for the prevention and treatment of hemolytic uremic syndrome in shiga toxin producing *Escherichia coli* infection. Curr Opin Infect Dis 17:479–82.
- Mack DR, Michail S, Wei S, et al. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. Am J Physiol 276:G941–50.
- Majowicz SE, Scallan E, Jones-Bitton A, et al. (2014). Global incidence of human Shiga toxin–producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. Foodborne Pathog Dis 11:447–55.
- Marzorati M, Vanhoecke B, De Ryck T, et al. (2014). The HMITM module: a new tool to study the host-microbiota interaction in the human gastrointestinal tract in vitro. BMC Microbiol 14:133.
- McFarland LV. (2015). From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. Clin Infect Dis 60:S85–S90.
- Medellin-Peña MJ, Griffiths MW. (2009). Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization. Appl Environ Microbiol 75:1165–72.
- Medellin-Peña MJ, Wang H, Johnson R, et al. (2007). Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. Appl Environ Microbiol 73:4259–67.
- Mellies JL, Thomas K, Turvey M, et al. (2012). Zinc-induced envelope stress diminishes type III secretion in enteropathogenic *Escherichia coli*. BMC Microbiol 12:123.
- Minekus M, Marteau P, Havenaar R, Huis in 'T Veld JHJ. (1995). A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. ATLA Altern Lab Anim 23:197–209.
- Minelli EB, Benini A. (2008). Relationship between number of bacteria and their probiotic effects. Microb Ecol Health Dis 20:180–3.
- Mohsin M, Guenther S, Schierack P, et al. (2015). Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 reduces growth, Shiga toxin expression, release and thus cytotoxicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol 305:20–6.
- Molly K, Vande Woestyne M, Verstraete W. (1993). Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. Appl Microbiol Biotechnol 39:254–8.
- Nakanishi N, Tashiro K, Kuhara S, et al. (2009). Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Microbiology (Reading, Engl.) 155:521–30.
- Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, et al. (2001a). Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxinproducing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. Infect Immun 69:1101–8.

- Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, et al. (2001b). Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. Int J Food Microbiol 68:135–40.
- Pacheco AR, Curtis MM, Ritchie JM, et al. (2012). Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. Nature 492:113–17.
- Pacheco AR, Sperandio V. (2012). Shiga toxin in enterohemorrhagic *E. coli*: regulation and novel anti-virulence strategies. Front Cell Infect Microbiol 2. [Epub ahead of print]. doi:10.3389/fcimb.2012.00081.
- Park H, Yeo S, Ji Y, et al. (2014). Autoinducer-2 associated inhibition by *Lactobacillus sakei* NR28 reduces virulence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Food Control 45:62–9.
- Paton AW, Chen AY, Wang H, et al. (2015). Protection against Shiga toxigenic *Escherichia coli* by non-GMO receptormimic bacterial ghosts. Infect Immun 83:3526–33.
- Paton AW, Morona R, Paton JC. (2000). A new biological agent for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. Nat Med 6:265–70.
- Payne AN, Zihler A, Chassard C, Lacroix C. (2012). Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. Trends Biotechnol 30:17–25.
- Pearson JS, Hartland EL. (2014). The inflammatory response during enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. Microbiol Spectr 2. [Epub ahead of print]. doi:10.1128/ microbiolspec.EHEC-0012-2013.
- Pedroso AF, Adesogan AT, Queiroz OCM, Williams SK. (2010). Control of *Escherichia coli* O157:H7 in corn silage with or without various inoculants: efficacy and mode of action. J Dairy Sci 93:1098–104.
- Persad AK, LeJeune JT. (2014). Animal reservoirs of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Microbiol Spectr 2. [Epub ahead of print]. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0027-2014.
- Phillips AD, Navabpour S, Hicks S, et al. (2000). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. Gut 47:377–81.
- Pifer R, Sperandio V. (2014). The Interplay between the microbiota and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Microbiol Spectr 2. [Epub ahead of print]. doi:10.1128/ microbiolspec.EHEC-0015-2013.
- Preidis GA, Hill C, Guerrant RL, et al. (2011). Probiotics, enteric and diarrheal diseases, and global health. Gastroenterology 140:8–14.
- Putaala H, Salusjärvi T, Nordström M, et al. (2008). Effect of four probiotic strains and *Escherichia coli* O157:H7 on tight junction integrity and cyclo-oxygenase expression. Res Microbiol 159:692–8.
- Rasko DA, Moreira CG, Li DR, et al. (2008). Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. Science 321:1078–80.
- Rasko DA, Sperandio V. (2010). Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. Nat Rev Drug Discov 9:117–28.
- Reading NC, Torres AG, Kendall MM, et al. (2007). A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. J Bacteriol 189:2468–76.

- Reissbrodt R, Hammes WP, dal Bello F, et al. (2009). Inhibition of growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by nonpathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 290:62–9.
- Ritchie JM. (2014). Animal models of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. Microbiol Spectr 2. [Epub ahead of print]. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0022-2013.
- Ruiz-Moyano S, Martín A, Benito MJ, et al. (2009). Safety and functional aspects of preselected enterococci for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. J Food Sci 74:M398–404.
- Rund SA, Rohde H, Sonnenborn U, Oelschlaeger TA. (2013). Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on EHEC strains of serotype O104:H4 and O157:H7. Int J Med Microbiol, 303:1–8.
- Russo P, de Chiara MLV, Vernile A, et al. (2014). Fresh-cut pineapple as a new carrier of probiotic lactic acid bacteria. BioMed Res Int 2014. [Epub ahead of print]. doi:10.1155/2014/309183.
- Salminen S, Wright AV. (2004). Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd ed. Boca Raton (FL): CRC Press.
- Sanders ME, Akkermans LMA, Haller D, et al. (2010). Safety assessment of probiotics for human use. Gut Microbes 1:164–85.
- Schüller S. (2011). Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium. Toxins 3:626–39.
- Sherman PM, Johnson-Henry KC, Yeung HP, et al. (2005). Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7- and enteropathogenic *E. coli* 0127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. Infect Immun 73:5183–8.
- Shu Q, Gill HS. (2002). Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. FEMS Immunol Med Microbiol 34:59–64.
- Siegler RL, Obrig TG, Pysher TJ, et al. (2003). Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome. Pediatr Nephrol (Berl Ger) 18:92–6.
- Smith JL, Fratamico PM, Gunther NWT, et al. (2014). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Adv Appl Microbiol 86:145–97.
- Snydman DR. (2008). The safety of probiotics. Clin Infect Dis 46:S104–11.
- Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, et al. (2003). Bacteria-host communication: the language of hormones. Proc Natl Acad Sci USA 100:8951–6.
- Spinler JK, Taweechotipatr M, Rognerud CL, et al. (2008). Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. Anaerobe 14:166–71.
- Stevens MP, Frankel GM. (2014). The locus of enterocyte effacement and associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Microbiol Spectr 2. [Epub ahead of print]. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0007-2013.
- Stöber H, Maier E, Schmidt H. (2010). Protective effects of Lactobacilli, Bifidobacteria and Staphylococci on the infection of cultured HT29 cells with different enterohemorrhagic Escherichia coli serotypes are strain-specific. Int J Food Microbiol 144:133–40.

132 👄 C. CORDONNIER ET AL.

- Szu SC, Ahmed A. (2014). Clinical studies of Escherichia coli 0157:H7 conjugate vaccines in adults and young children. Microbiol Spectr 2. [Epub ahead of print]. doi: 10.1128/ microbiolspec.EHEC-0016-2013.
- Tahamtan Y, Kargar M, Namdar N, et al. (2011). Probiotic inhibits the cytopathic effect induced by *Escherichia coli* 0157:H7 in Vero cell line model. Lett Appl Microbiol 52:527–31.
- Takahashi M, Taguchi H, Yamaguchi H, et al. (2004). The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. FEMS Immunol Med Microbiol 41:219–26.
- Thévenot J, Cordonnier C, Rougeron A, et al. (2015). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection has donordependent effect on human gut microbiota and may be antagonized by probiotic yeast during interaction with Peyer's patches. Appl Microbiol Biotechnol 99:9097–110.
- Thévenot J, Etienne-Mesmin L, Denis S, et al. (2013). Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 survival in an in vitro model of the human large intestine and interactions with probiotic yeasts and resident microbiota. Appl Environ Microbiol 79:1058–64.
- Thomas DE, Elliott EJ. (2013). Interventions for preventing diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: systematic review. BMC Public Health 13:799.
- Tobe T, Nakanishi N, Sugimoto N. (2011). Activation of motility by sensing short-chain fatty acids via two steps in a flagellar gene regulatory cascade in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun 79:1016–24.
- McWilliams BD, Torres AG. (2014). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* adhesins. Microbiol Spectr 2. [Epub ahead of print]. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0003-2013.
- Trachtman H, Cnaan A, Christen E, et al. Investigators of the HUS-SYNSORB Pk Multicenter Clinical Trial. (2003). Effect of

an oral Shiga toxin-binding agent on diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome in children: a randomized controlled trial. JAMA 290:1337–44.

- Tran SL, Billoud L, Lewis SB, et al. (2014). Shiga toxin production and translocation during microaerobic human colonic infection with Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 and O104:H4. Cell Microbiol 16:1255–66.
- Tsai YT, Cheng PC, Pan TM. (2010). Immunomodulating activity of *Lactobacillus paracasei* subsp. paracasei NTU 101 in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157H7-infected mice. J Agric Food Chem 58:11265–72.
- Turková K, Mavrič A, Narat M, et al. (2013). Evaluation of Lactobacillus strains for selected probiotic properties. Folia Microbiol (Praha) 58:261–7.
- Varankovich NV, Nickerson MT, Korber DR. (2015). Probioticbased strategies for therapeutic and prophylactic use against multiple gastrointestinal diseases. Front Microbiol 6:685.
- Venugopalan V, Shriner KA, Wong-Beringer A. (2010). Regulatory oversight and safety of probiotic use. Emerging Infect Dis 16:1661–5.
- Walters M, Sperandio V. (2006). Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. Int J Med Microbiol 296:125–31.
- Yang B, Feng L, Wang F, Wang L. (2015). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* senses low biotin status in the large intestine for colonization and infection. Nat Commun 6:6592.
- Yoshimura K, Matsui T, Itoh K. (2010). Prevention of *Escherichia coli* O157:H7 infection in gnotobiotic mice associated with *Bifidobacterium* strains. Antonie Van Leeuwenhoek 97:107–17.
- Zhao B, Houry WA. (2010). Acid stress response in enteropathogenic gammaproteobacteria: an aptitude for survival. Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell 88:301–14.

DEUXIÈME PARTIE

- Travaux expérimentaux -

Dans cette DEUXIÈME PARTIE, sont exposés les travaux réalisés au cours de cette thèse financée par la région (Bourse CPER), s'inscrivant dans le projet « Auvergne STEC risque » né d'une collaboration entre l'EA-CIDAM, le M2isH, l'UR454 Microbiologie de l'INRA de Clermont-Fd/Theix, Lallemand, et l'UR Calytiss de VetAgro Sup.

Les résultats expérimentaux sont présentés sous la forme de quatre publications dont les objectifs étaient l'étude *in vitro* et *in vivo* du comportement de souches EHEC dans le tractus digestif humain et l'influence d'un traitement probiotique avec la levure *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856.

SOMMAIRE

CHAPITRE 1 : COMPORTEMENT DE LA LEVURE PROBIOTIQUE S. CEREVISIAE CNCM I-3850 LE TRACTUS DIGESTIF HUMAIN SIMULÉ	5 DANS 143
Introduction à la publication n°1	143
<u>Publication n°1</u> : « Dynamic in vitro models of the human gastrointestinal tract as relevant to assess the survival of probiotic strains and their interactions with gut microbiota » Commentaires de la publication n°1	ols to 145 169
CHAPITRE 2 : INFLUENCE D'UN TRAITEMENT PROBIOTIQUE PRÉVENTIF SUR LA SURVIE PATHOGÉNICITÉ DES EHEC DANS L'ENVIRONNEMENT COLIQUE HUMAIN SIMULÉ	ET LA
Introduction à la publication n°2	173
Publication n°2 : « Enterohemorrhagic E. coli infection has donor-dependent effect on hum microbiota and may be antagonized by probiotic yeast during interaction with Peyer's patche	an gut s »177
Commentaires de la publication n°2	193
CHAPITRE 3 : INTERACTION DES EHEC AVEC L'ÉPITHELIUM INTESTINAL	199
Introduction a la publication n°3	199
<u>Publication n°3 :</u> « Enterohemorrhagic Escherichia coli pathogenesis : role of Long polar fill in Peyer's patches interactions »	<i>nbriae</i> 203
Commentaires de la publication n°3	229
CHAPITRE 4 : SURVIE ET VIRULENCE DES EHEC DANS L'ENVIRONNEMENT DIGESTIF SIMU L'ENFANT	□LÉ DE 237
Introduction à la publication n°4	237
<u>Publication n°4 :</u> « Increased EHEC survival and virulence gene expression indicate an enpression pathogenicity upon simulated pediatric gastrointestinal conditions »	<i>hanced</i> 239
Commentaires de la publication nº4	251
	231

CHAPITRE 1:

COMPORTEMENT DE LA LEVURE PROBIOTIQUE S. cerevisiae CNCM I-3856 DANS LE TRACTUS DIGESTIF HUMAIN SIMULÉ

Introduction à la publication n°1

L'absence de traitement spécifique contre les EHEC et le fait que l'antibiothérapie augmente le risque de complications en cas de diarrhées sanglantes ont conduit à s'intéresser à des moyens préventifs et/ou curatifs alternatifs, comme l'utilisation de probiotiques. Les probiotiques sont définis comme des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte » (FAO/WHO 2002 ; Hill et *al.*, 2014). Ainsi, afin de satisfaire à cette définition, ces micro-organismes doivent survivre aux conditions digestives, persister temporairement dans le tractus digestif et présenter une activité qui doit se traduire par des effets positifs pour l'hôte, activité souvent médiée par une modulation bénéfique du microbiote intestinal (Sanders, 2008). La survie du probiotique va être conditionnée par de nombreux facteurs et en particulier par son mode d'administration (matrice alimentaire, forme galénique...).

Parmi les microorganismes probiotiques les plus courants on retrouve des bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. La levure *Saccharomyces boulardii* est également un probiotique fréquemment utilisé chez l'Homme depuis une quarantaine d'années. Cette souche a montré son efficacité dans le traitement des diarrhées associées à la prise d'antibiotiques et possède des propriétés antagonistes intéressantes vis-àvis de différents pathogènes dont les EHEC. En effet, des études *in vitro* ont montré que *S*.

boulardii diminuait l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires dans les cellules coliques T84 infectées par *E. coli* O157:H7, et ce, uniquement lorsque le traitement probiotique était antérieur à l'infection (Dahan et *al.*, 2003 ; Dalmasso et *al.*, 2006).

En plus de S. boulardii, une nouvelle souche de levure probiotique a été récemment commercialisée aux Etats-Unis par la société Lesaffre® pour un usage chez l'Homme (Lynside Pro GI+, Lesaffre Human Care, USA) : la souche S. cerevisiae CNCM I-3856. Cette levure (i) a déjà montré des propriétés anti-inflammatoires dans un modèle de colite induite chez la souris (Foligné et al. 2010), (ii) prévient l'augmentation de perméabilité intestinale et les signes de colite induite par les AIEC dans un modèle murin de la maladie de Crohn (Sivignon et al., 2015), (iii) réduit l'inconfort digestif et les douleurs abdominales chez des patients atteints du syndrome de l'intestin irritable (Pineton de Chambrun et al., 2015) et (iv) diminue la synthèse de cytokines pro-inflammatoires induite par une infection à ETEC dans un modèle in vitro de culture intestinale porcine (Zanello et al., 2011). De plus, les travaux précédents réalisés au laboratoire ont permis de mettre en évidence l'effet antagoniste vis-à-vis d'E. coli O157:H7 de la levure S. cerevisiae CNCM I-3856 qui diminue significativement la reprise de croissance du pathogène dans les parties distales de l'intestin grêle dans le système digestif artificiel TIM 1 (Etienne-Mesmin et al., 2011). Même si les études citées ci-dessus ont établi certaines propriétés bénéfiques de S. cerevisiae CNCM I-3856, il existe très peu de données sur sa capacité à survivre dans l'environnement digestif humain et ses interactions avec le microbiote intestinal de l'hôte.

L'objectif de cette étude était d'évaluer la survie de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 dans l'ensemble du tractus digestif *in vitro* grâce au potentiel des modèles TIM-1 (reproduisant l'estomac et intestin grêle) et ARCOL (mimant le côlon). L'influence du probiotique sur le microbiote colique implanté dans le modèle ARCOL a également été étudiée, ainsi que celle de la matrice alimentaire sur sa survie dans le modèle TIM-1.

PUBLICATION N°1

Dynamic *in vitro* models of the human gastrointestinal tract as relevant tools to assess the survival of probiotic strains and their interactions with gut microbiota

2015 – Microorganisms – (Premier impact factor en 2017)

<u>Charlotte CORDONNIER</u>^{*}, Jonathan THÉVENOT^{*}, Lucie ETIENNE-MESMIN, Sylvain DENIS, Monique ALRIC, Valérie LIVRELLI et Stéphanie BLANQUET-DIOT

*co-premier auteurs

OPEN ACCESS **microorganisms** ISSN 2076-2607 www.mdpi.com/journal/microorganisms

Article

Dynamic *In Vitro* Models of the Human Gastrointestinal Tract as Relevant Tools to Assess the Survival of Probiotic Strains and Their Interactions with Gut Microbiota

Charlotte Cordonnier ^{1,2,†}, Jonathan Thévenot ^{1,2,†}, Lucie Etienne-Mesmin ^{1,2}, Sylvain Denis ¹, Monique Alric ¹, Valérie Livrelli ^{2,3} and Stéphanie Blanquet-Diot ^{1,*}

¹ Équipe d'Accueil Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament (EA 4678 CIDAM), Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, Université d'Auvergne, Centre Biomédical de Recherche et de Valorisation (CBRV) 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France; E-Mails: charlotte.cordonnier@udamail.fr (C.C.); thevenot.jonathan@gmail.com (J.T.); lucie.etiennemesmin@yahoo.fr (L.E.-M.); sylvain.denis@udamail.fr (S.D.); monique.alric@udamail.fr (M.A.)

- ² Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte (M2iSH), Unité Mixte de Recherche Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (UMR INSERM) / Université d'Auvergne U1071 Unité Sous Contrat - Institut National de Recherche Agronomique (USC-INRA) 2018, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, Université d'Auvergne, CBRV 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France; E-Mail: valerie.livrelli@udamail.fr
- ³ Service de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU), Clermont-Ferrand, 58 rue Montalembert, 63000 Clermont-Ferrand, France
- [†] These authors contributed equally to this work.
- * Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: stephanie.blanquet@udamail.fr; Tel.: +33-473-178-390; Fax: +33-473-178-392.

Academic Editor: Carl Gordon Johnston

Received: 8 June 2015 / Accepted: 11 September 2015 / Published: 23 October 2015

Abstract: The beneficial effects of probiotics are conditioned by their survival during passage through the human gastrointestinal tract and their ability to favorably influence gut microbiota. The main objective of this study was to use dynamic *in vitro* models of the human digestive tract to investigate the effect of fasted or fed state on the survival kinetics of the new probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain CNCM I-3856 and to assess its influence on intestinal microbiota composition and activity. The probiotic yeast showed
a high survival rate in the upper gastrointestinal tract whatever the route of admistration, *i.e.*, within a glass of water or a Western-type meal. *S. cerevisiae* CNCM I-3856 was more sensitive to colonic conditions, as the strain was not able to colonize within the bioreactor despite a twice daily administration. The main bacterial populations of the gut microbiota, as well as the production of short chain fatty acids were not influenced by the probiotic treatment. However, the effect of the probiotic on the gut microbiota was found to be individual dependent. This study shows that dynamic *in vitro* models can be advantageously used to provide useful insight into the behavior of probiotic strains in the human digestive environment.

Keywords: probiotic; *Saccharomyces cerevisiae*; survival; *in vitro* models; human gastrointestinal tract; intestinal microbiota; food matrix

1. Introduction

Probiotics are defined as "live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host" [1]. The most commonly used probiotics are lactic acid bacteria such as *Lactobacilli*, *Enterococci* or *Bifidobacteria*. Even if most studies about probiotics have focused primarily on bacteria, there are also many reports showing the potential of probiotic yeasts [2]. Among them, *Saccharomyces cerevisiae* var *boulardii* has long been known to be effective for treating acute and chronic intestinal diseases [3–5]. The main mechanisms of action of probiotic yeast are (i) the direct or indirect inhibition of intestinal pathogens, (ii) the modification of host signaling pathways, especially those involved in inflammatory response, (iii) the stimulation of the immune system, and (iv) the trophic effects on intestinal mucosa [3–5].

Although only *S. boulardii* has been widely studied and its inhibitory mechanisms are well defined, other yeast strains have been considered for their probiotic properties. In particular, *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 is a new probiotic yeast, which has been shown to decrease inflammation in a mouse model of chemically-induced colitis [6], to prevent colitis induced by AIEC (adherent-invasive *Escherichia coli*) in the transgenic mice model mimicking Crohn's disease [7] and to reduce digestive discomfort and abdominal pain in patients with irritable bowel syndrome [8]. *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 has also shown interesting antagonistic properties against other pathogenic *Escherichia coli*, such as ETEC (enterotoxigenic *E. coli*) and EHEC (enterohemorrhagic *E. coli*). Zanello *et al.*, have shown that viable *S. cerevisiae* CNCM I-3856 inhibits the ETEC-induced pro-inflammatory pathways in porcine intestinal epithelial cells [9]. Using relevant dynamic *in vitro* models of the upper and lower human gastrointestinal tract, Etienne-Mesmin *et al.*, and Thévenot *et al.*, have revealed that this probiotic yeast significantly reduces the growth resumption of EHEC O157:H7 observed in the distal parts of the small intestine and decreases Shiga-toxin expression in the large intestine [10–12].

Although the above studies have provided evidence of the effectiveness of *S. cerevisiae* CNCM I-3856, the mode of action of this probiotic yeast still needs to be clarified. In particular,

very little published data are available on its survival in the human digestive environment [10,13], and information about its interactions with human microbiota is clearly missing, although these two parameters are key features of probiotic strains.

In this context, the aim of the present study was to use the potential of dynamic *in vitro* digestion models to expand the current knowledge on the behavior of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 in the human digestive tract. In the first step, the influence of fed or fasted conditions on *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 survival in the upper human gastrointestinal tract was investigated using the gastric and small intestinal model TIM-1 (TNO gastroIntestinal Model-1). The probiotic showed a high resistance to the gastric and small intestine environment whatever the mode of administration. In a second step, the yeast survival in human colonic conditions was assessed using the ARCOL (artificial colon) model, as well as its effects on human gut microbiota composition and metabolic activity. *S. cerevisiae* CNCM I-3856 was not able to colonize in the large intestinal conditions but had an individual-dependent effect on gut microbiota profiles. TIM-1 and ARCOL provide clarification on the behavior of the probiotic yeast strain during digestion in humans.

2. Experimental Section

2.1. Yeast Strain

The yeast strain *S. cerevisiae* CNCM I-3856 (Lynside Pro GI⁺, Lesaffre Human Care, Marcq-en-Baroeul, France) was supplied in its active dried powder form and administered into the TIM-1 and ARCOL at a concentration of 10⁷ CFU/mL.

2.2. Simulated Human Digestive Conditions

2.2.1. In Vitro Digestion in the TIM-1 System

The gastro-intestinal TIM-1 system (TNO, Zeist, The Netherlands) is a multi-compartmental, dynamic, computer-controlled model that simulates the upper human gastro-intestinal tract (Table 1). TIM-1 consists of four successive compartments simulating the conditions found in the stomach and the three segments of the small intestine in humans, *i.e.*, the duodenum, jejunum, and ileum. The main parameters of human digestion, such as pH, body temperature, peristaltic mixing and transport, gastric, biliary and pancreatic secretions, and passive absorption of small molecules and water, are reproduced as accurately as possible. Briefly, each compartment is composed of glass units with a flexible inner membrane. Peristaltic mixing and body temperature are achieved by pumping water at 37 °C into the space between the glass jacket and the flexible wall at regular intervals. Mathematical modeling of gastric and ileal deliveries with a power exponential equation [14] is used for the computer control of chyme transit. In the Elashoff equation $(f = 1 - 2^{-(\frac{t}{t_{1/2}})^{\beta}})$, $t_{1/2}$ is the half time of gastric or ileal emptying and β a coefficient describing the shape of the curve. Chyme transport through the TIM-1 is regulated by the peristaltic valves that connect the successive compartments. The volume in each compartment is monitored by a pressure sensor, and pH is computer-monitored and continuously controlled by adding either HCl (gastric compartment) or NaHCO₃ (intestinal compartments). Simulated gastric, biliary

and pancreatic secretions are introduced into the corresponding compartments by computer-controlled pumps. Water and products of digestion are removed from the jejunal and ileal compartments by pumping dialysis liquid through hollow fiber membranes (SF 90G, Nipro[®], Osaka, Japan, with a molecular mass cut-off value of 10 kDa). Before each experiment, the system is washed with detergent, rinsed with water and decontaminated by steaming at 105 °C for 45 min.



Table 1. Schematic representation of TIM-1 and ARCOL.

Schematic representation of TIM-1 from [15]: A: gastric compartment; B: pyloric sphincter; C: duodenal compartment; D: peristaltic valves; E: jejunal compartment; F: peristaltic valves; G: ileal compartment; H: ileal-cecal valve; I: gastric secretion (lipase, pepsin); J: duodenal secretion (bile, pancreatic juice, electrolytes); K: bicarbonate secretion; L: pre-filter; M: filtration system; N: filtrate with bio-accessible fraction; O: hollow fiber system (cross section); P: pH electrodes; Q: level sensors; R: temperature sensors; S: pressure sensor. Schematic representation of ARCOL: A2: reactor with double thermal jacket; B2: sparger; C2: rushton impeller; D2: marine impeller; E2: condenser; F2: redox sensor; G2: pressure control; H2: inoculum inlet; I2: pH sensor; J2: temperature sensor; K2: level sensor; L2: NaOH inlet; M2: sampling system; N2: medium inlet; O2: medium outlet; P2: N₂ (only before inoculation with fecal sample); Q2: gas outlet; R2: filter system; S2: dialysis inlet; T2: dialysis outlet; U2: dialysis fiber; V2: colonic medium.

The TIM-1 system was programmed to reproduce according to *in vivo* data the physicochemical conditions observed during the digestion of a glass of water (fasted state, n = 3) or a solid meal (fed state, n = 4) in a healthy human adult (Table 2). The total duration of the experiments was 300 min. In the fasted state, the suspension (200 mL) that was introduced into the TIM-1 system consisted of mineral water (Volvic[®], Danone, Volvic, France) inoculated with *S. cerevisiae* CNCM I-3856 in powder form (final concentration 10⁷ CFU/mL). The test meal used in the fed protocol was composed of 16.3 g of mixed diced vegetables, 2.5 g of salad dressing, 25 g of undercooked ground beef, 7.8 g of instant mashed potato, 16.3 g of Ultra High Temperature (UHT) full-cream milk, 4 g of cream cheese, 25 g of applesauce and 15 g of sliced white bread. The volume

of the meal was adjusted to 300 mL with mineral water (Volvic[®], France), homogenized for 20 min with an Ultra Turrax system (T25, IKA[®], Werke, Staufen, Germany) set at 24,000 rpm before inoculation of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 in powder form (final concentration 10^7 CFU/mL). Samples were taken in the initial suspensions (glass of water or solid meal) before introduction into the artificial stomach and regularly collected during digestion in the different compartments of the TIM-1 system, as well as in the cumulative ileal effluents kept on ice and pooled hour-by-hour in order to determine the survival rate of the probiotic yeast in the upper gastrointestinal tract. Control digestions with a transit marker were carried out under the same experimental conditions (n = 3 with fasted protocol, n = 4 with fed protocol) by using water containing 0.8% (wt/vol) of blue dextran as the initial suspension [16].

2.2.2. In Vitro Fermentation in the ARCOL Model

ARCOL is a one-stage semi-continuous fermentation system (Applikon, Schiedam, The Netherlands) that integrates the main parameters of the in vivo human colonic environment, including pH, body temperature, supply of ileal effluents, retention time, anaerobiosis maintained by the sole activity of resident microbiota, and passive absorption of water and fermentation metabolites [12] (Table 1). Fresh feces from healthy volunteers who had no history of antibiotic or probiotic treatment 3 months before the study were used to inoculate the bioreactor. The fecal inoculum was prepared under strict anaerobic conditions in a vinyl anaerobic chamber (Coy, Grass Lake, MI, USA). Stools (≈ 50 g) were mixed with 350 mL of a 200 mM sodium phosphate buffer and filtered through a double layer of gauze. The fecal suspension was rapidly transferred to the bioreactor, flushed with O₂-free N₂ gas, and brought to 450 mL with culture medium. The ARCOL model was run under conditions reproducing a healthy human colon with a fixed temperature of 37 °C, a controlled constant pH of 6.3, a mean retention time of 36 h and a redox potential (*Eh*) of -400 mV. The nutritive medium, which was sequentially introduced into the bioreactor, contained various carbohydrate, protein, lipid, mineral and vitamin sources, in order to closely mimic the composition of the ileal effluents [17]. The fermentative process allowed the maintenance of anaerobic conditions in the bioreactor, with the initial sparging with O₂-free N₂ gas being stopped after inoculation. A dialysis system using hollow fiber membranes (molecular mass cut-off value of 30 kDa) maintained the appropriate electrolyte and metabolite concentrations and the operating volume. Two experimental schemes (n = 3 for each condition) were used: (i) no supplementation and (ii) twice daily supplementation with S. cerevisiae CNCM I-3856 re-suspended in sterile saline water (final concentration in the bioreactor of 10^7 CFU/mL). Each experiment started after a 4-day stabilization phase and was done in triplicate using feces collected from three different volunteers. Samples were taken immediately after inoculation of the probiotic yeast and regularly collected from the colonic medium to determine its survival kinetics in the large intestine. In parallel, the main bacterial populations of human intestinal microbiota were followed by real-time quantitative PCR (qPCR) analysis. Dialysis outflows of the ARCOL model were daily sampled to determine short chain fatty acid (SCFA) production by gas chromatography.



Table 2. Parameters of *in vitro* digestions in the TIM-1 model.

U: unity; USP: United States Pharmacopeia. The Elashoff equation $(f = 1 - 2^{-t_{1/2}})$, where f represents the fraction of meal delivered and t the time of delivery, $t_{1/2}$ the half-time of delivery, and β a coefficient describing the shape of the curve, was used for the computer control of gastric and ileal deliveries in the TIM-1 system [14].

2.3. Yeast Survival in the in Vitro Gastrointestinal Tract

The survival of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 in the TIM-1 and ARCOL systems was determined by plating on Sabouraud dextrose agar supplemented with gentamicin (10 μ g/L) and chloramphenicol (50 μ g/L) followed by incubation at 30 °C during 48 h. The number of culturable cells was determined by visual counting and used as an indicator of probiotic survival. In the TIM-1 system, results were expressed as percentages of initial intake and were cross-compared to those obtained with the blue dextran transit marker. This compound is a non-absorbable transit marker, which indicates a 100% survival percentage for yeast. Its concentrations throughout the TIM-1 fluctuate according to the volume of each digestive compartment, the rate of dilution by digestive secretions and the chyme flow between two successive compartments. Thereby, yeast curves below that of the transit marker will reflect cell mortality, while curves above the transit marker will be indicative of yeast growth renewal. Concentrations of blue dextran in the digestive samples from the TIM-1 system were determined colorimetrically using a Multisckan spectrum (Thermo Scientific, Schaumburg, IL, USA) at 595 nm. In the ARCOL system, results were expressed as log₁₀ colony forming units (CFU)/mL. Bacterial concentrations were normalized with respect to the amount on the last day of the stabilization phase.

2.4. Composition and Metabolic Activity of Human Colonic Microbiota

Total genomic DNA was extracted from 250 μ L of colonic medium by using the two first steps of Yu and Morrison's protocol [18] and the QIAamp DNA stool minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions. The main bacterial populations of human intestinal microbiota (*Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Bifidobacteria, Bacteroides, Enterobacteriaceae, Lactococcus/Pediococcus/Leuconostoc, E. coli, Faecalibacterium prausnitzii*) were followed in the ARCOL model by qPCR analysis, as previously described by Thévenot *et al.* [12]. Primers used in this study are listed in Table 3.

SCFAs production in the ARCOL model was determinated by gas chromatography. Dialysis outflows supplemented with internal standard (2-ethyl butyric acid at 49 mmol/L) were deproteinized by the addition of saturated phosphotungstic acid (500 g/L), centrifuged at 9000× g for 20 min before supernatants were filtered (0.45 μ g/L). The samples were run through a Agilent 6890 Series GC System (Agilent Technologies, Massy, France) fitted with an HP-INNOWax column (0.25 mm × 30 m × 0.25 μ m) and a flame ionization detector. Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 2 mL/min. The injector and detector were set at 250 °C. The column was maintained in an oven with a temperature gradient ranging from 110 to 240 °C. One microliter quantity of each sample was injected with a run time of 14.3 min. Peaks were integrated using the HP ChemStation software. SCFA concentrations were quantified by comparing their peak areas with the corresponding standards.

Name	Sequence 5'-3'	Target	Annealing Temperature (°C)	References
SYBR green				
BAC338F	ACTCCTACGGGAGGCAG	m - 11	50	5101
BAC516F	GTATTACCGCGGCTGCTG	Total bacteria	58	[19]
789cfbF	CRAACAGGATTAGATACCCT	Paatamidatas	61	[20]
cfb967R	GGTAAGGTTCCTCGCGTAT	Bacterolaeles	01	[20]
Act920F3	TACGGCCGCAAGGCTA	Antinohantaria	61	[20]
Act1200R	TCRTCCCCACCTTCCTCCG	Acunobaciena		
928F-Firm	TGAAACTYAAAGGAATTGACG	Firmiautas	61	[20]
1040FirmR	ACCATGCACCACCTGTC	rumicules		
Eco1457F	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC	Enterobactoriacaa	63	[21]
Eco1652R	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	Emerobaciernaceae		
F_Lacto05	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	Lactobacillus/Padiococcus/Lauconostoc	60	[22]
R_Lacto04	CGCCACTGGTGTCTYTCCATATA	Laciobacinius/Teulococcus/Leuconosioc	00	[22]
F_Fpra 428	TGTAAACTCCTGTTGTTGAGGAAGATAA	Faacalibactarium prausnitzii	60	[23]
R_Fpra 583	GCGCTCCCTTTACACCCA	Γαεταιθατιεπία βιαιδπίζα	00	[23]
TaqMan				
F_Bact 1369	CGGTGAATACGTTCCCGG		60	[22]
P_TM1389F	FAM-CTTGTACACACCGCCCGTC-TAMRA	Total bacteria		
R_Prok1492R	TACGGCTACCTTGTTACGACTT			
E. coli-F	CATGCCGCGTGTATGAAGAA			[24]
E. coli-P	FAM-TATTAACTTTACTCCCTTCCTCCCCGCTGAA-TAMRA	Escherichia coli	60	[24]
E. coli-R	CGGGTAACGTCAATGAGCAAA			
F_Bifid 09c	CGGGTGAGTAATGCGTGACC			[22]
P_Bifid	FAM-CTCCTGGAAACGGGTG-TAMRA	Bifidobacteria	60	[22]
R_Bifid 06	TGATAGGACGCGACCCCA			
F_Bacter 11	CCTWCGATGGATAGGGGTT		60	[22]
P_Bac303	YY-AAGGTCCCCCACATTG-TAMRA	Bacteroides/Prevotella		
R_Bacter 08	CACGCTACTTGGCTGGTTCAG			

Table 3. Primer and probe sequences used in real-time qPCR assays.	
---	--

2.5. Statistical Analysis

For all experiments, significant differences in survival between treatments and time points were tested using a nonparametric analysis of repeated measures with the "f1.ld.f1" function of the package "nparLD" [25] in R 3.1.2 [26]. In case of a significant treatment effect, the function "npar.t.test" of the package "nparcomp" [27] was used for each time point. In case of a significant interaction effect, a linear mixed effect model with a random intercept on experiments to take into account the repeated measures was performed and followed by function "difflsmeans" of the package "lmerTest" [28]. The agglomerative hierarchical clustering with the "hclust" function was used to cluster treatments depending on their composition in major bacterial populations (*Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroides, Lactococcus/Pediococcus/Leuconostoc, Enterobacteriaceae*).

3. Results

3.1. Yeast Viability in the Upper Gastro-Intestinal Tract

The viability of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 was evaluated in each compartment of TIM-1 (Figure 1a) and in the ileal effluents (Figure 1b) by cross-comparing the curves obtained for the yeast and the blue dextran transit marker in the two experimental conditions (fasted and fed state). When the probiotic was administered within a glass of water, the yeasts showed a high resistance to gastric, duodenal and jejunal conditions as no significant differences could be noticed between the curves obtained for the probiotic yeast and the transit marker (p > 0.05). In the ileal compartment, cell mortality was observed from 30 to 180 min of digestion (p < 0.05). When the probiotic was administered with the solid meal, it was found to be sensitive to the gastric conditions, since cell mortality was observed from 120 min digestion (p < 0.01). In the small intestinal compartments, yeast recovery followed a similar trend to that of the transit marker, except for the ileal compartment where the yeast population significantly decreased at 180 and 240 min of digestion (p < 0.05). From 180 min of digestion, the probiotic was recovered longer in the jejunum and ileum under the fed state, due to slower transit time.

The cumulative ileal delivery of culturable yeasts is shown in Figure 1b. Under the fasted condition, no significant differences were observed between the yeast and the transit marker. At the end of digestion (300 min), 71.4% \pm 44.6% of the initial amount of yeast was recovered in the ileal effluents compared to 95.5 % \pm 0.5% for the transit marker (p > 0.05). Under the fed condition, a significant loss of viability was observed for *S. cerevisiae* CNCM I-3856 from 240 min of digestion (p < 0.05). At the end of digestion, 51.2% \pm 8.7% of the initial amount of yeast was recovered in the ileal effluents compared to 66.9% \pm 0.1% for the transit marker (p < 0.001). Under the fasted and fed state, the amount of culturable yeasts likely to reach the large intestine was 6.1 \pm 0.01 and 6.8 \pm 0.09 log₁₀ CFU/mL, respectively.

As in the TIM-1 system the transit flow, and consequently, the recovery percentages of the transit marker depend on the digestive protocol (fed or fasted), the results obtained for the probiotic yeast were normalized to the values of blue dextran in each condition. This allowed us to really assess the impact of food matrix on the survival of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 in the *in vitro* human gastrointestinal tract. Figure 2 shows that yeast survival rate in the ileal effluents of the TIM-1 system was not influenced by the routes of administration, *i.e.*, within a glass of water or a complete meal (p > 0.05).



Figure 1. Survival of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 in the gastro-intestinal TIM-1 system when ingested within a glass of water ("fasted state") or a Western diet meal ("fed state"). Recovery profiles of yeast (dotted line) in the digestive compartments (**a**) and in the cumulative ileal effluents (**b**) are compared to that of the blue dextran transit marker (solid line). Values are given as mean percentages of initial intake \pm the standard deviations (n = 3 for the fasted protocol, n = 4 for the fed protocol). Significant differences between yeast and transit marker are indicated (p < 0.05 (*), p < 0.01 (***), p < 0.001 (***)).



Figure 2. Influence of food matrix on yeast survival rate in the ileal effluents of the TIM-1 system. Recovery profiles of yeast under fasted (dotted line) and fed conditions (solid line) are indicated. Values are given as mean percentages of viable yeast normalized to the transit marker at each time point ($\Delta\%$) \pm the standard deviations (n = 3 for the fasted protocol, n = 4 for the fed protocol).

3.2. Yeast Viability in the Lower Gastro-Intestinal Tract

Figure 3 shows the number of culturable *S. cerevisiae* CNCM I-3856 in the ARCOL model following twice daily pulse administration of the probiotic. Following each injection, yeast concentrations immediately reached a peak level around $7\log_{10}$ CFU/mL. However, these initial levels did not persist in the colonic medium. Indeed, the probiotic was quickly cleared from the bioreactor after each injection (except for the first one) and most times disappeared from the colonic medium between two consecutive additions. On average, at 12 h post administration, from 0 to 2 log $_{10}$ CFU/mL of viable yeasts were found in the bioreactor. Besides, no significant difference was observed between yeast survival kinetics in the large intestinal conditions for the three donors included in this study.



Figure 3. Survival kinetics of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 in the ARCOL model after twice daily administration of the probiotic. Results are expressed in \log_{10} CFU/mL for Donors 1 (in black), 2 (in pink) and 3 (in green).

3.3. Influence of Probiotic Yeast on Human Colonic Microbiota Composition and Metabolic Activity

The major phyla of gut microbiota and their main members were quantified in the ARCOL model by qPCR using 16S rRNA targeted oligonucleotide specific primers. Whatever the time of fermentation and the treatment (control or probiotic treatment with S. cerevisiae CNCM I-3856), no significant change was observed in the levels of the selected populations when the data obtained for the three donors were averaged (Figure 4). To further investigate the effect of probiotic supplementation on each individual's gut microbiota, an agglomerative hierarchical clustering on the major phyla and genus (Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroides, Lactococcus/Pediococcus/Leuconostoc, Enterobacteriaceae) was used to gather the data (Figure 5a). The resulting heat map of clustering shows the individual variations in response to the different treatments (Figure 5b). Irrespective of the stool donors, all control samples (no supplementation) were found in the same cluster. Conversely, S. cerevisiae CNCM I-3856 had individual-dependent effects on colonic microbiota. As an example, in Donor 3, yeast treatment led to a decrease in Lactococcus/Pediococcus/Leuconostoc and an increase in Enterobacteriaceae. In Donor 2, probiotic treatment led to a decrease in Bacteroidetes. Interestingly, Donor 1 and Donor 3, who are male, showed profiles more closely related than that of Donor 2, who is a female. To further investigate the effects of the probiotic on the colonic microbiota, its metabolic activity was followed daily by assessing the production of major and minor SCFAs in the dialysis outflows of the ARCOL model. Whatever the treatment, acetate was the main metabolite produced, then followed by propionate and butyrate (Table 4). The percentages of acetate, propionate and butyrate in the dialysis outflows were around 67%, 19% and 14% of major SCFA, respectively. The yeast treatment did not induce any modification in SCFA production compared to the control experimentations (p > 0.05).



Figure 4. Effect of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 on the main populations of colonic microbiota in the ARCOL model. Results are expressed as mean \log_{10} copy number/mL \pm the standard deviations (n = 3).

а



Figure 5. Cont.



Figure 5. Individual-dependent effect of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 on the colonic microbiota in the ARCOL model. An agglomerative hierarchical clustering (\mathbf{a}) and the resulting heat map (\mathbf{b}) were made based on the results obtained from the qPCR analysis of the main bacterial groups of colonic microbiota. The labels of the dendrogram indicate for each sample the treatment-donor-day of fermentation. Heat map coloring refers to the concentration values: high values are represented in green, while low values are represented in red.

SCFA	Control	S. cerevisiae CNCM I-3856
Acetate	67.2 ± 3.6	66.9 ± 3.0
Propionate	18.5 ± 2.6	18.7 ± 2.2
Butyrate	14.4 ± 2.0	14.4 ± 1.9
iso-Butyrate	1.9 ± 0.3	2.1 ± 0.2
Valerate	4.1 ± 1.0	4.8 ± 0.7
iso-Valerate	2.7 ± 0.4	3.0 ± 0.3
Hexanoic acid	2.5 ± 1.2	2.8 ± 1.7
Heptanoic acid	0.3 ± 0.3	0.6 ± 0.6

Table 4. Influence of probiotic treatment on short chain fatty acid production.

Data are the mean percentages of total SCFA (defined as the sum of acetate, propionate and butyrate) \pm the standard deviations (n = 3), for the overall fermentation period.

4. Discussion

Survival in the human gastrointestinal tract is generally considered as a key feature for probiotics to preserve their health-promoting effects. However, due to the cost and complexity of *in vivo* studies in human subjects, most of the available data focus on the fecal recovery of probiotics and little

is known about their behavior throughout the digestive tract, which is considered as a black box. For ethical, technical, regulatory and financial reasons, *in vitro* digestive models can be used as an alternative to human studies, provided that their relevance has been fully demonstrated compared to the *in vivo* situation [29,30]. In this context, the aim of the present study was to use relevant *in vitro* models of the upper (TIM-1) and lower (ARCOL) gastrointestinal tract to assess the survival in the human digestive environment of the new probiotic yeast *S. cerevisiae* CNCM I-3856. Previous *in vitro* and *in vivo* studies have already established the beneficial effects of this strain [7–9], but up to date little is known about its behavior during digestion in human. In particular, there is no published data reporting its survival in humans volunteers.

The probiotic survival rate in the human digestive tract will depend on the means of administration. In particular, probiotic viability is conditioned by the food matrix in which the probiotics are ingested [31,32] and the galenic form for their oral administration [33–35]. Since a previous study has already established the effect of dosage forms (capsule or tablet) on the survival rate of S. cerevisiae CNCM I-3856 in the TIM-1 model [13], we focused in this work on the effect of food matrix when the probiotic was administered in its active dried powder form. S. cerevisiae CNCM I-3856 was introduced into the TIM-1 system within a glass of water or a Western-type meal at a physiological dose [8], and the model was set-up according to *in vivo* data to mimic the fasted and fed states in healthy human adults. The main digestive parameters influenced by food intake, such as drop in gastric pH, half-time of gastric emptying, time of gastrointestinal transit and luminal concentrations of digestive secretions were taken into account in the TIM-1 model [36–41]. The probiotic yeast showed a high resistance during its transit through the *in vitro* upper gastrointestinal tract, proving its ability to face stressful environmental conditions such as gastric acidity or bile secretion in the intestine. According to our results, as much as 6.4 $\log_{10} \pm 0.05$ CFU/mL of culturable yeasts are likely to reach the human colon, where they are mostly supposed to exert their health effect on the host [7,8]. The beneficial effects of S. boulardii are dependent on the viable yeast concentration in the digestive tract [42]. Even if the minimal dose required for a probiotic effect is still debated, it was suggested that the concentration of cells needed to obtain a clinical effect in the small bowel was quoted to be 10^6 CFU/mL [43]. This implies that the concentrations of S. cerevisiae CNCM I-3856 reaching the large intestine would be sufficient to exert their potential beneficial effect. In addition, yeast survival in the ileal effluents was not dependent on the fed or fasted conditions. To the best of our knowledge, no studies have investigated the influence of food vehicle on the survival of probiotic yeast in the upper human gastro-intestinal tract. Our results suggest that the probiotic should be indifferently administered under fed or fasted conditions to ensure a high viability when entering the colon. Nevertheless, from 180 min of digestion, probiotic cells were present longer in the jejunum and ileum under the fed state, due to slower transit time. This may have an impact on probiotic activity if the strain has a targeted action in the distal parts of the small intestine.

Once the gastric and small intestinal barriers are crossed, the probiotics have to succeed in competing with the resident colonic microbiota. In this study, a rapid elimination of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 from the ARCOL model was noticed, despite a twice daily supplementation with the probiotic. These results suggest that the yeast was strongly affected by the colonic conditions. This extensive elimination may result from the barrier effect of the endogenous microbiota and is fully in line with the available data in humans where *S. boulardii* or other strains of *S. cerevisiae* were eliminated from fecal samples

within two to three days after cessation of treatment [44,45]. Our results suggest that the major barrier to the survival of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 is not the acidic gastric environment, as previously suggested for *S. boulardii* [46,47], but rather the conditions found in the large intestine.

Since our results indicated that gut microbiota may have a key role in the colonization of S. cerevisiae CNCM I-3856, we investigated for the first time the effect of its supplementation on gut microbiota composition and activity. When the results obtained with the three volunteers (one female and two males ranging from 24 to 46 years old) were averaged, we found that the probiotic yeast influenced neither the main populations of the gut microbiota nor the production of SCFAs. Our results are in agreement with those previously published on S. boulardii reporting that this yeast has no major effect on the fecal microbiota composition and metabolic activity in healthy subjects [48,49]. Nevertheless, when the effect of S. cerevisiae CNCM I-3856 was assessed on each individual microbiota, the response to the probiotic treatment was found to be subject-dependent. Even if the number of donor remains relatively low, this is the first study reporting an individual-dependent effect of a treatment with a probiotic yeast on the human gut microbiota. Therefore, despite a low survival rate under colonic conditions, S. cerevisiae CNCM I-3856 seemed to have the capacity to influence the gut microbiota at the individual level. A possible difference between males and females was suggested but has to be confirmed using a larger number of donors. Bolnich et al. have shown that microbiota could be influenced by several parameters as diet environment and genotype, sex being just one of many possible genetic polymorphisms [50]. Nevertheless, such a difference in microbial profiles was not linked with any variation in SCFA production between the three volunteers. All of these experimentations have been carried out with feces from healthy subjects. Some studies have shown that S. boulardii is able to modulate gut microbial composition under unhealthy conditions, such as in patients with long-term total enteral nutrition [51] or in obese and type 2 diabetic mice [52]. Therefore, it would be of great interest to assess the effect of S. cerevisiae CNCM I-3856 in the ARCOL model inoculated with dysbiosis microbiota from diseased individuals (*i.e.*, IBS patients).

5. Conclusions

In conclusion, this study shows that dynamic *in vitro* models of the upper and lower gastrointestinal tract such as TIM-1 and ARCOL can provide significant insight into the behavior of probiotic strains during digestion in humans. In particular, we showed that the major barrier in the colonization of the new probiotic strain *S. cerevisiae* CNCM I-3856 was not the acidic environment of the stomach but rather the competition with resident colonic microbiota. The survival of the yeast in the ileal effluents was not influenced by fed or fasted conditions, giving valuable information on the probiotic mode of administration in human subjects. Interestingly, the effect of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 on the gut microbiota was shown to be individual-dependent, suggesting that human individuals should respond differentially to the probiotic treatment.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the French Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche to Jonathan Thévenot and Lucie Etienne-Mesmin; and from

Conseil Régional Auvergne (Grant Contrat Plan État Région Axe Territoire, Agriculture, Alimentation et Nutrition Santé Humaine Auvergne STEC Risque, CPER T2ANSH ASTERISK) to Charlotte Cordonnier, Équipe d'Accueil Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament, and Unité Mixte de Recherche Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale/Université d'Auvergne U1071 Unité Sous Contrat - Institut National de Recherche Agronomique 2018. We thank the Lesaffre Compagny for providing the *S. cerevisiae* CNCM I-3856 strain, Sandrine Chalancon for her technical assistance and Julie Seby for her help in ARCOL experiments.

Author Contributions

Stéphanie Blanquet-Diot and Valérie Livrelli are the research supervisors of Charlotte Cordonnier, Jonathan Thévenot and Lucie Etienne-Mesmin. Charlotte Cordonnier, Jonathan Thévenot, Lucie Etienne-Mesmin, Sylvain Denis and Stéphanie Blanquet-Diot conceived and designed the experiments. Charlotte Cordonnier, Jonathan Thévenot, Lucie Etienne-Mesmin performed the experiments and analyzed the data. Charlotte Cordonnier, Jonathan Thévenot, and Stéphanie Blanquet-Diot wrote the paper. Monique Alric assisted in the final editing of the manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; *et al.*. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014, *11*, 506–514.
- 2. Hatoum, R.; Labrie, S.; Fliss, I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: From fundamental to novel applications. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 1–12.
- 3. Kelesidis, T.; Pothoulakis, C. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **2012**, *5*, 111–125.
- 4. Im, E.; Pothoulakis, C. Recent advances in *Saccharomyces boulardii* research. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **2010**, *34*, S62–S70.
- 5. McFarland, L.V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J. Gastroenterol.* **2010**, *16*, 2202–2222.
- Foligné, B.; Dewulf, J.; Vandekerckove, P.; Pignède, G.; Pot, B. Probiotic yeasts: Anti-inflammatory potential of various non-pathogenic strains in experimental colitis in mice. *World J. Gastroenterol.* 2010, 16, 2134–2145.
- Sivignon, A.; de Vallée, A.; Barnich, N.; Denizot, J.; Darcha, C.; Pignède, G.; Vandekerckove, P.; Darfeuille-Michaud, A. *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 prevents colitis induces by AIEC bacteria in transgenic mouse model mimicking Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2015, 21, 276–286.

- 8. De Chambrun, G.P.; Neut, C.; Chau, A.; Cazaubiel, M.; Pelerin, F.; Justen, P.; Desreumaux, P. A randomized clinical trial of *Saccharomyces cerevisiae versus* placebo in the irritable bowel syndrome. *Dig. Liver Dis.* **2015**, *47*, 119–1
- Zanello, G.; Berri, M.; Dupont, J.; Sizaret, P.Y.; D'Inca, R.; Salmon, H.; Meurens, F. Saccharomyces cerevisiae modulates immune gene expressions and inhibits ETEC-mediated ERK1/2 and p38 signaling pathways in intestinal epithelial cells. *PLoS ONE* 2011, doi:10.1371/journal.pone.0018573.
- Etienne-Mesmin, L.; Livrelli, V.; Privat, M.; Denis, S.; Cardot, J.M.; Alric, M.; Blanquet-Diot, S. Effect of a new probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in a dynamic gastrointestinal model. *Appl. Environ. Microb.* 2011, 77, 1127–1131.
- Thévenot, J.; Cordonnier, C.; Rougeron, A.; Le Goff, O.; Nguyen, H.T.T.; Denis, S.; Alric, M.; Livrelli, V.; Blanquet-Diot, S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection has donor-dependent effect on human gut microbiota and may be antagonized by probiotic yeast during interaction with Peyer's patches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015, *99*, 1–14.
- Thévenot, J.; Etienne-Mesmin, L.; Denis, S.; Chalancon, S.; Alric, M.; Livrelli, V.; Blanquet-Diot, S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 survival in an *in vitro* model of the human large intestine and interactions with probiotic yeasts and resident microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013, 79, 1058–1064.
- Blanquet-Diot, S.; Denis, S.; Chalancon, S.; Chaira, F.; Cardot, J.M.; Alric, M. Use of artificial digestive systems to investigate the biopharmaceutical factors influencing the survival of probiotic yeast during gastrointestinal transit in humans. *Pharm. Res.* 2012, 29, 1444–1453.
- Elashoff, J.D.; Reedy, T.J.; Meyer, J.H. Analysis of gastric emptying data. *Gastroenterology* 1982, 83, 1306–1312.
- 15. Minekus, M. The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM). In *The Impact of Food Bioactives on Health*; Springer: Doetinchem, The Netherlands, 2015; pp. 37–46.
- 16. Minekus, M.; Marteau, P.; Havenaar, R.; Huis in't Veld, J.H. A multi-compartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *ATLA* **1995**, *23*, 197–209.
- 17. Macfarlane, G.; Macfarlane, S.; Gibson, G. Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microb. Ecol.* **1998**, *35*, 180–187.
- 18. Yu, Z.; Morrison, M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* **2004**, *36*, 808–813.
- Yu, Y.; Lee, C.; Kim, J.; Hwang, S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol. Bioeng.* 2005, 89, 670–679.
- Bacchetti De Gregoris, T.; Aldred, N.; Clare, A.S.; Burgess, J.G. Improvement of phylum-and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *J. Microbiol. Meth.* 2011, 86, 351–356.
- 21. Bartosch, S.; Fite, A.; Macfarlane, G.T.; McMurdo, M.E. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using

real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl. Environ. Microb.* **2004**, *70*, 3575–3581.

- 22. Furet, J.P.; Firmesse, O.; Gourmelon, M.; Bridonneau, C.; Tap, J.; Mondot, S.; Doré, J.; Corthier, G. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2009**, *68*, 351–362.
- Martinez-Medina, M.; Denizot, J.; Dreux, N.; Robin, F.; Billard, E.; Bonnet, R.; Darfeuille-Michaud, A.; Barnich, N. Western diet induces dysbiosis with increased *E. coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut* 2014, 63, 116–124.
- Huijsdens, X.W.; Linskens, R.K.; Mak, M.; Meuwissen, S.G.; Vandenbroucke-Grauls, C.M.; Savelkoul, P.H. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 4423–4427.
- Noguchi, K.; Gel, Y.R.; Brunner, E.; Konietschke, F. nparLD: An R software package for the nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. *J. Stat. Softw.* 2012, 50, 1–23.
- 26. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2014.
- Konietschke, F.; Placzek, M.; Schaarschmidt, F.; Hothorn, L.A. nparcomp: An R software package for nonparametric multiple comparisons and simultaneous confidence intervals. *J. Stat. Softw.* 2015, 64, 1–17.
- Kuznetsova, A.; Bruun Brockhoff, P.; Haubo Bojesen Christensen, R. ImerTest: Tests in Linear Mixed Effects Models, 2014; R package version 2.0-20. Available online: https://cran.r-project.org/web/packages/ImerTest/index.html (accessed on 25 September 2015).
- Guerra, A.; Etienne-Mesmin, L.; Livrelli, V.; Denis, S.; Blanquet-Diot, S.; Alric, M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends Biotechnol.* 2012, *30*, 591–600.
- 30. Payne, A.N.; Zihler, A.; Chassard, C.; Lacroix, C. Advances and perspectives in *in vitro* human gut fermentation modeling. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 17–25.
- Do Espirito Santo, A.P.; Perego, P.; Converti, A.; Oliveira, M.N. Influence of food matrices on probiotic viability—A review focusing on the fruity bases. *Trends Food Sci. Technol.* 2011, 22, 377–385.
- 32. Possemiers, S.; Marzorati, M.; Verstraete, W.; van de Wiele, T. Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *141*, 97–103.
- Graff, S.; Chaumeil, J.C.; Boy, P.; Lai-Kuen, R.; Charrueau, C. Formulations for protecting the probiotic *Saccharomyces boulardii* from degradation in acidic condition. *Biol. Pharm. Bull.* 2008, *31*, 266–272.
- Ghelardi, E.; Celandroni, F.; Salvetti, S.; Gueye, S.; Lupetti, A.; Senesi, S. Survival and persistence of *Bacillus clausii* in the human gastrointestinal tract following oral administration as spore-based probiotic formulation. *J. Appl. Microbiol.* 2015, *119*, 552–559.

- Cheow, W.S.; Kiew, T.Y.; Hadinoto, K. Controlled release of *Lactobacillus rhamnosus* biofilm probiotics from alginate-locust bean gum microcapsules. *Carbohydr. Polym.* 2014, 103, 587–595.
- Koziolek, M.; Grimm, M.; Becker, D.; Iordanov, V.; Zou, H.; Shimizu, J.; Wanke, C.; Garbacz, G.; Weitschies, W. Investigation of pH and temperature profiles in the GI tract of fasted human subjects using the Intellicap[®] system. *J. Pharm. Sci.* 2015, *104*, 2855–2863.
- 37. Murray, R.; Eddy, D.E.; Bartoli, W.P.; Paul, G.L. Gastric emptying of water and isocaloric carbohydrate solutions consumed at rest. *Med. Sci. Sports Exerc.* **1994**, *26*, 725–732.
- Worsøe, J.; Fynne, L.; Gregersen, T.; Schlageter, V.; Christensen, L.A.; Dahlerup, J.F.; Rijkhoff, N.J.; Laurberg, S.; Krogh, K. Gastric transit and small intestinal transit time and motility assessed by a magnet tracking system. *BMC Gastroenterol.* 2011, *11*, 1–10.
- 39. Mattioli, G. Pancreatic secretory response to ordinary meals: Studies with pure pancreatic juice. *Gastroenterology* **1988**, *94*, 426–433.
- 40. Northfield, T.; McColl, I. Postprandial concentrations of free and conjugated bile acids down the length of the normal human small intestine. *Gut* **1973**, *14*, 513–518.
- 41. Vertzoni, M.; Archontaki, H.; Reppas, C. Determination of intralumenal individual bile acids by HPLC with charged aerosol detection. *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 2690–2695.
- 42. Elmer, G.; McFarland, L.; Surawicz, C.; Danko, L.; Greenberg, R. Behaviour of *Saccharomyces boulardii* in recurrent *Clostridium difficile* disease patients. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **1999**, *13*, 1663–1668.
- 43. Minelli, E.B.; Benini, A. Relationship between number of bacteria and their probiotic effects. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2008**, *20*, 180–183.
- 44. Klein, S.M.; Elmer, G.W.; McFarland, L.V.; Surawicz, C.M.; Levy, R.H. Recovery and elimination of the biotherapeutic agent, *Saccharomyces boulardii*, in healthy human volunteers. *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 1615–1619.
- 45. Pecquet, S.; Guillaumin, D.; Tancrede, C.; Andremont, A. Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* elimination from the intestines of human volunteers and effect of this yeast on resistance to microbial colonization in gnotobiotic mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 3049–3051.
- Fietto, J.L.; Araújo, R.S.; Valadão, F.N.; Fietto, L.G.; Brandão, R.L.; Neves, M.J.; Gomes, F.C.; Nicoli, J.R.; Castro, I.M. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Can. J. Microbiol.* 2004, 50, 615–621.
- 47. Graff, S.; Chaumeil, J.C.; Boy, P.; Lai-Kuen, R.; Charrueau, C. Influence of pH conditions on the viability of *Saccharomyces boulardii* yeast. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2008**, *54*, 221–227.
- Swidsinski, A.; Loening-Baucke, V.; Kirsch, S.; Doerffel, Y. Functional biostructure of colonic microbiota (central fermenting area, germinal stock area and separating mucus layer) in healthy subjects and patients with diarrhea treated with *Saccharomyces boulardii*. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 2010, *34*, S79–S92.
- 49. Vanhoutte, T.; de Preter, V.; de Brandt, E.; Verbeke, K.; Swings, J.; Huys, G. Molecular monitoring of the fecal microbiota of healthy human subjects during administration of lactulose and *Saccharomyces boulardii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 5990–5997.

- Bolnick, D.I.; Snowberg, L.K.; Hirsch, P.E.; Lauber, C.L.; Parks, B.; Lusis, A.J.; Knight, R.; Caporaso, J.G.; Svanbäck, R. Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota. *Nat. Commun.* 2014, *5*, 1–13.
- Schneider, S.M.; Girard-Pipau, F.; Filippi, J.; Hébuterne, X.; Moyse, D.; Hinojosa, G.C.; Pompei, A.; Rampal, P. Effects of *Saccharomyces boulardii* on fecal short-chain fatty acids and microflora in patients on long-term total enteral nutrition. *World J. Gastroenterol.* 2005, *11*, 6165–6169.
- 52. Everard, A.; Matamoros, S.; Geurts, L.; Delzenne, N.M.; Cani, P.D. *Saccharomyces boulardii* administration changes gut microbiota and reduces hepatic steatosis, low-grade inflammation, and fat mass in obese and type 2 diabetic db/db mice. *MBio* **2014**, *5*, e01011–e01014.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

COMMENTAIRES DE LA PUBLICATION N°1

L'objectif de cette étude était d'utiliser les modèles de digestion TIM-1 et ARCOL afin d'évaluer la survie de la levure probiotique *S. cerevisiae* CNCM I-3856 dans l'ensemble du tractus digestif humain *in vitro* et son interaction avec le microbiote colique.

Ainsi, nous avons déterminé (i) la survie de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 dans l'estomac et l'intestin grêle du TIM-1 et l'influence du mode d'administration « eau » ou « repas complet » sur cette survie, (ii) la survie du probiotique dans l'environnement colique humain simulé dans le modèle ARCOL et (iii) son influence sur les principales populations bactériennes du microbiote colique et son activité métabolique.

Survie de S. cerevisiae CNCM I-3856 dans l'estomac et l'intestin grêle in vitro

La viabilité de S. cerevisiae CNCM I-3856 dans le TIM 1 a été évaluée après administration de 3x10⁹ UFC de levures, en accord avec les doses utilisées dans les essais cliniques (Pineton de Chambrun et al., 2015). Les résultats indiquent un taux de survie proche de 100% dans l'estomac et l'intestin grêle artificiels. Les levures montrent donc une grande résistance aux conditions gastro-intestinales (pH gastrique acide, sécrétions digestives), ce qui est bien sûr une propriété très intéressante pour une souche probiotique. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus dans le même modèle in vitro pour une autre souche de S. cerevisiae (Blanquet et al., 2003). De plus, une étude récente a montré que la présence d'une forme galénique particulière (encapsulation de levures dans des gélules) permet d'augmenter encore le taux de survie de S. cerevisiae, puisqu'il semble même que la levure « formulée » soit capable de se multiplier dans l'environnement digestif avec une viabilité de l'ordre de 180 % en fin de digestion (Blanquet-Diot et al., 2012). Dans le même modèle in vitro TIM-1, la survie de différentes souches probiotiques bactériennes a également été évaluée et les résultats ont montré une forte mortalité pour la majorité d'entre elles (Blanquet et al., 2004 ; Marteau et al., 1997). Ainsi, les pourcentages cumulés de bactéries vivantes dans les effluents iléaux du modèle en fin de digestion étaient d'environ 50%, 30%, 40% et 1%, respectivement pour Bifidobacterium bifidum, Lb. acidophilus, Lb. casei spp ramnosus et Streptococcus thermophilus (Blanquet et al., 2004; Marteau et al., 1997) contre 76 % pour les

levures *S. cerevisiae* (Blanquet et *al.*, 2004). Comparativement aux bactéries lactiques très couramment utilisées comme probiotiques, le taux de survie élevé des levures dans l'environnement digestif humain simulé peut être un argument en faveur du choix de ces dernières dans la perspective de développement d'un probiotique pour prévenir et/ou traiter les infections à des pathogènes alimentaires, comme les EHEC. Les résultats de survie obtenus dans notre étude sont basés sur la détermination du nombre de bactéries cultivables. Des données supplémentaires sur l'état physiologique des cellules durant leur transit dans l'estomac et l'intestin grêle pourraient être obtenues grâce à d'autres techniques comme la PCR couplée à un traitement au monoazide propidium ou la cytométrie en flux.

Influence de la matrice alimentaire sur la survie de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 dans l'estomac et l'intestin grêle *in vitro*

Les potentialités du système digestif artificiel TIM 1 permettent d'étudier l'influence de la matrice alimentaire sur la survie de micro-organismes, en différenciant les paramètres de digestion d'un repas solide, semi-solide ou liquide, et ce, en modifiant notamment les temps de transit gastro-intestinaux, les paramètres de vidange gastrique et iléale, les concentrations en enzymes digestives et en bile et l'évolution des pH dans les différents compartiments digestifs. Afin de déterminer l'influence de la matrice alimentaire sur la survie de *S. cerevisiae* CNCM I-3856, nous avons évalué le taux de survie de la levure dans le TIM 1 lorsque celle-ci est administrée avec de l'eau ou en présence d'une matrice alimentaire représentative d'un repas « occidental complet ». La survie de la levure est évaluée au cours du temps, compartiment par compartiment, en comparant les profils obtenus pour le probiotique avec ceux du marqueur de transit, ces profils variant en fonction de la matrice alimentaire ingérée. Nos résultats montrent que la présence de la matrice alimentaire « eau » ou « repas complet » n'influence pas la survie du probiotique dans le tractus gastro-intestinal humain.

Nos résultats suggèrent donc que *S. cerevisiae* CNCM I-3856 peut être ingérée indifféremment avec de l'eau ou avec un repas sans influer sur sa survie dans le tractus digestif supérieur. Ces résultats sont contradictoires à ceux classiquement observés pour des souches probiotiques en modèles *in vitro* statiques où la survie des microorganismes est améliorée en présence d'aliments (Klingberg et Budde, 2006 ; Possemiers et *al.*, 2010). En effet, l'aliment, et plus précisément les lipides qui le constituent, confère un rôle protecteur contre l'acidité gastrique

(Leyral et Vierling, 2007 ; Moller et *al.*, 2012). La présence d'une matrice alimentaire offre ainsi la possibilité de former des niches où peuvent régner des conditions moins stressantes pour les microorganismes (moins d'acidité ou de sels biliaires). La différence entre les résultats obtenus dans le TIM 1 et dans les modèles *in vitro* statiques peut s'expliquer par le fait que ces modèles, contrairement au TIM 1 et à ce qui est observé *in vivo* chez l'homme, reproduisent l'effet « physique » de la matrice alimentaire mais ne tiennent pas compte de l'influence de cette matrice sur les paramètres de digestion comme pH, temps de transit, temps de vidange gastrique et iléale et concentrations en enzymes digestives.

Survie de S. cerevisiae CNCM I-3856 dans l'environnement colique in vitro

Nos résultats montrent que, malgré une administration bi-quotidienne des levures probiotiques, celles-ci ne se maintiennent pas dans l'environnement colique in vitro aux concentrations initiales. Ces données de survie in vitro corroborent celles décrite in vivo chez l'Homme pour différentes souches de S. cerevisiae où une élimination rapide des levures est observée dans les échantillons fécaux dès arrêt du traitement (Klein et al., 1993 ; Pecquet et al., 1991). Ainsi les souches de levures probiotiques, telles que S. boulardii ou encore S. cerevisiae sont éliminées du tractus digestif des mammifères hébergeant un microbiote intestinal complexe en deux à trois jours (Martins et al., 2007). Ces résultats suggèrent que les levures S. cerevisiae CNCM I-3856 sont affectées par les conditions rencontrées au niveau du côlon. Cette élimination de l'environnement colique peut être due à l'effet barrière du microbiote intestinal (Pecquet et al. 1991; Klein et al. 1993) mais aussi à l'hydrolyse des constituants de la paroi des levures, principalement des résidus polysaccharides glucanes et mannanes, par des enzymes produites par les bactéries du microbiote endogène (Salyers et al., 1978). Même si S. cerevisiae CNCMI-3856 est rapidement éliminée de l'environnement colique, des quantités supérieures à 4.5x10⁶ UFC sont maintenues dans le fermenteur pendant 6h après administration du probiotique. Des concentrations dans le côlon supérieures ou égales à 10^8 UFC/g de matières fécales sont généralement associées à des effets cliniques pour les souches de probiotiques, cette dose pouvant varier d'un facteur 10 à 100 (Minelli et Benini, 2008).

Influence de *S. cerevisiae* CNCM-I3856 sur les principales populations du microbiote colique et son activité métabolique

Aucun effet de l'administration de la levure *S. cerevisiae* CNCM I-3856 sur les principales populations du microbiote colique n'a été observé par analyse qPCR lorsque les données des trois donneurs sont moyennées. Afin d'analyser les variations inter-individuelles du microbiote en réponse au traitement probiotique, une classification hiérarchique ascendante a été effectuée. Les résultats obtenus montrent que les échantillons « Témoins » des trois donneurs (sans ajout du probiotique) sont regroupés dans un même cluster tandis que l'administration de la levure divise nos échantillons en deux groupes différents suggérant que l'influence de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 pourrait être individu dépendant. Ces résultats constituent les premières données suggérant l'existence d'une réponse individuelle à une levure probiotique au niveau de la composition du microbiote colique et devront être confirmés par l'utilisation d'inocula fécaux provenant d'un plus grand nombre de donneurs. L'utilisation de techniques de séquençage haut débit permettrait également d'obtenir une vision plus complète des modifications engendrées par la souche probiotique sur le microbiote colique.

Afin d'analyser plus en détails l'effet du probiotique sur le microbiote intestinal, son activité métabolique a été suivie par le suivi de la production des AGCC majoritaires et minoritaires dans les dialysats du système ARCOL. Le traitement probiotique n'entraine pas de différence dans l'activité métabolique du microbiote et les proportions des différents AGCC restent inchangées. Ces résultats *in vitro* corrèlent les données *in vivo* obtenues avec *S. boulardii* montrant que la levure n'a pas d'effet sur la composition du microbiote fécal ni sur son activité métabolique chez des individus sains (Swidsinski et *al.,* 2010; Vanhoutte et *al.,* 2006). *A contrario*, des études ont montré que *S. boulardii* était capable de moduler la composition du microbiote lors d'une situation de dysbiose chez des patients ayant une nutrition entérale (Schneider et *al.,* 2015) ou dans un modèle de souris obèses ou développant un diabète de type 2 (Everard et *al.,* 2014). Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'influence de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 dans le modèle ARCOL inoculé avec un microbiote en situation de dysbiose.

CHAPITRE 2 :

INFLUENCE D'UN TRAITEMENT PROBIOTIQUE PRÉVENTIF SUR LA SURVIE ET LA PATHOGÉNICITÉ DES EHEC DANS L'ENVIRONNEMENT COLIQUE HUMAIN SIMULÉ

Introduction à la publication n°2

Par manque de modèles d'études adaptés, peu de données sur la survie et la pathogénicité des EHEC dans l'environnement digestif humain, en particulier dans l'iléon terminal et le côlon, principaux sites d'actions suggérés chez l'Homme (Chong et *al.*, 2007 ; Mariani-Kurkdjian et Bonacorsi, 2014 ; Lewis et *al.*, 2014), sont disponibles malgré leur importance dans la compréhension de la physiopathologie bactérienne. À ce jour, une seule étude s'est intéressée à la survie d'une souche EHEC O157:H7 EDL933 dans l'environnement colique humain. À l'aide d'un fermenteur ensemencé avec le microbiote fécal humain issu d'un donneur, Thévenot et *al.* (2013) ont montré l'élimination progressive du pathogène dans l'environnement colique humain simulé. Par contre, aucune donnée n'est disponible sur la régulation des gènes de virulence des EHEC dans ces conditions.

L'environnement colique humain se caractérise par la présence d'un microbiote dont l'interaction avec le pathogène n'a été que peu étudiée. Néanmoins, plusieurs études suggèrent l'importance de ce type d'interactions (Gamage et *al.*, 2003 ; Gamage et *al.*, 2006 ; de Sablet et *al.*, 2009 ; Toshima, Hachio et *al.*, 2007). En effet, de Sablet et *al.* (2009) ont montré, *in vitro* et *ex vivo*, dans des contenus cæcaux de rats associés à un microbiote intestinal humain, que des facteurs solubles sécrétés par une espèce majeure du microbiote intestinal humain, *Bacteroides thetaiotaomicron*, peuvent réprimer la synthèse de Stx chez O157:H7. Des résultats similaires ont été obtenus par Iversen et *al.* (2015), alors que Pacheco et *al.* (2012) démontrent que cette même bactérie contribue à la virulence des EHEC en clivant les résidus fucose des mucines. Des colicines produites par les bactéries colicinogéniques peuvent aussi augmenter la production de Stx (Toshima, Yoshimura et *al.*, 2007). Par ailleurs, la présence du microbiote commensal de l'intestin murin réduit la colonisation par *E. coli* O157:H7 (Gamage et *al.*, 2006). Enfin, Thévenot et *al.* (2013) n'ont montré, dans leur modèle *in vitro* de l'environnement colique humain, aucune modification des principales populations bactériennes du microbiote par la souche EHEC O157:H7 EDL933.

Par ailleurs, comme d'autres pathogènes entériques, les EHEC ont un tropisme particulier pour les plaques de Peyer (Phillips et *al.*, 2000). Etienne-Mesmin, Livrelli et *al.* (2011) ont montré *in vitro* en culture cellulaire, que les cellules M sont une voie de passage préférentielle de ces bactéries pathogènes qui seraient internalisées dans les macrophages des plaques de Peyer. Les Shiga-toxines induiraient alors l'apoptose de ces macrophages conduisant au relargage des bactéries et des toxines dans la *lamina propria*. De plus, la production de Shiga-toxines induit des lésions hémorragiques au niveau des plaques de Peyer. Les bactéries seraient finalement détruites, mais les toxines libres rejoindraient alors la circulation sanguine avant d'atteindre les organes cibles (reins, intestin et cerveau) et induire des dommages.

Dans la lutte contre les EHEC, différents moyens préventifs et/ou curatifs alternatifs ont été envisagés, comme l'utilisation de probiotiques. La levure *S. boulardii* est un probiotique fréquemment utilisé chez l'homme dans le traitement des diarrhées associées à la prise d'antibiotiques et a montré *in vitro* et *in vivo* des propriétés antagonistes intéressantes vis-à-vis de différents pathogènes, dont les EHEC (Dahan et *al.* 2003 ; Dalmasso et *al.* 2006). Etienne-Mesmin, Livrelli et *al.* (2011) ont montré qu'une autre levure probiotique, la souche *S. cerevisiae* CNCM I-3856, co-administrée avec *E. coli* O157:H7, diminuait significativement la reprise de croissance du pathogène dans les parties distales de l'intestin grêle dans le système digestif artificiel TIM 1. L'administration simultanée de *S. cerevisiae* et d'*E. coli* O157:H7 dans des conditions coliques humaines *in vitro* n'a cependant montré aucun effet du probiotique sur la survie du pathogène (Thévenot et *al.*, 2013). Enfin, différentes études rapportent l'intérêt des propriétés des souches probiotiques qui augmentent l'effet barrière de l'épithélium intestinal ou

limitent l'adhésion, l'entrée ou la translocation du pathogène, en cas d'infections par des EHEC (Fukuda et *al.*, 2012 ; Johnson-Henry et *al.*, 2008 ; Putaala et *al.*, 2008).

Nous nous donc sommes intéressés à l'effet des levures probiotiques *S. cerevisiae* CNCM I-3856 sur la survie et la pathogénicité de la souche *E. coli* O157:H7 EDL933 dans l'environnement colique humain simulé, lorsque celles-ci sont administrées préalablement à l'ajout du pathogène et en post-exposition, et non co-administrées avec les EHEC comme dans l'étude de Thevenot et *al.* (2013). Nous avons utilisé pour reproduire l'environnement colique humain un fermenteur de type semi-continu développé par l'EA CIDAM, le système ARCOL. Ces travaux ont également permis d'évaluer l'influence de la souche *E. coli* O157:H7 et/ou du probiotique sur le microbiote intestinal humain, lorsque trois donneurs différents de selles sont impliqués (comparativement à un unique donneur dans l'étude précédente de Thévenot et *al.*, (2013)). Enfin, dans le but de compléter les données obtenues *in vitro*, l'effet antagoniste de la levure probiotique vis-à-vis de l'interaction d'EDL 933 avec l'épithélium intestinal, et en particulier les Plaques de Peyer, a été testé en modèle murin.

PUBLICATION N°2

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection has donor-dependent effect on human gut microbiota and may be antagonized by probiotic yeast during interaction with Peyer's patches

2015 – Applied Microbiology Biotechnology – (Impact factor₂₀₁₆: 3.376)

Jonathan THÉVENOT^{*}, <u>Charlotte CORDONNIER^{*}</u>, Amandine ROUGERON, Olivier LE GOFF, Hang T. T. NGUYEN, Sylvain DENIS, Monique ALRIC, Valérie LIVRELLI et Stéphanie BLANQUET-DIOT

*co-premier auteurs

APPLIED MICROBIAL AND CELL PHYSIOLOGY



Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection has donor-dependent effect on human gut microbiota and may be antagonized by probiotic yeast during interaction with Peyer's patches

J. Thévenot^{1,2} · C. Cordonnier^{1,2} · A. Rougeron² · O. Le Goff¹ · H. T. T. Nguyen² · S. Denis¹ · M. Alric¹ · V. Livrelli^{2,3} · S. Blanquet-Diot¹

Received: 27 March 2015 / Revised: 13 May 2015 / Accepted: 17 May 2015 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are major food-borne pathogens responsible for serious infections ranging from mild diarrhea to hemorrhagic colitis and life-threatening complications. Shiga toxins (Stxs) are the main virulence factor of EHEC. The antagonistic effect of a prophylactic treatment with the probiotic strain *Saccharomyces cerevisiae* against EHEC O157:H7 was investigated using complementary in vitro human colonic model and in vivo murine ileal loop assays. In vitro, the probiotic treatment had no effect on O157:H7 survival but favorably influenced gut microbiota activity through modulation of short-chain fatty acid production, increasing acetate production and decreasing that of butyrate. Both pathogen and probiotic strains had individual-dependent effects on human gut microbiota. For the first time, *stx* expression was followed in human colonic environment: at

J. Thévenot and C. Cordonnier contributed equally to this manuscript.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00253-015-6704-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Blanquet-Diot stephanie.blanquet@udamail.fr

- ¹ Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, EA 4678 CIDAM, Conception Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament, Clermont Université, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France
- ² Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, M2iSH, Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte UMR INSERM / Université d'Auvergne U1071 USC-INRA 2018, Clermont Université, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France
- ³ Service de Bactériologie, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

9 and 12 h post EHEC infection, probiotic treatment significantly decreased *stx* mRNA levels. Besides, in murine ileal loops, the probiotic yeast specifically exerted a trophic effect on intestinal mucosa and inhibited O157:H7 interactions with Peyer's patches and subsequent hemorrhagic lesions. Taken together, the results suggest that *S. cerevisiae* may be useful in the fight against EHEC infection and that host associated factors such as microbiota could influence clinical evolution of EHEC infection and the effectiveness of probiotics.

Keywords Colonic in vitro model · Mice ileal loops · Gut microbiota · Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) · Probiotic · *Saccharomyces cerevisiae*

Introduction

Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) are major foodborne zoonotic agents associated with outbreaks worldwide that pose a serious public health concern. Characteristics of EHEC infection include abdominal pain and watery diarrhea, as well as hemorrhagic colitis, which in the most severe cases (10 to 15 %) can lead to the life-threatening complication hemolytic uremic syndrome (HUS) (Serna and Boedeker 2008). The majority of food poisoning outbreaks is caused by strains of the serotype O157:H7. Ruminants, especially cattle, are a major reservoir of EHEC, and infections are typically acquired through the ingestion of contaminated food. Production of Shiga toxin (Stx) is the main virulence feature associated with severe human disease but it cannot be solely responsible for full pathogenicity. EHEC belong to a group of enteric pathogens that induce cytoskeletal rearrangements in infected epithelial cells, resulting in loss of enterocyte microvilli and intimate attachment of the bacterium to cell surface

and leading to the formation of attaching and effacing (A/E) lesions. The genes responsible for A/E lesions are located on a "pathogenicity island" identified as the locus of enterocyte effacement (LEE). The terminal ileum and colon are assumed to be the main sites of EHEC colonization (Chong et al. 2007; Shigeno et al. 2002). In vitro and ex vivo experiments have shown a preferential tropism of EHEC to the follicule-associated epithelium (FAE) of small-intestinal Peyer's patches (PPs) (Lewis et al. 2015; Phillips et al. 2000). Recent works by Etienne-Mesmin et al. (2011b) have demonstrated that the uptake of EHEC by M cells and underlying macrophages in the PPs would be a critical step in Stx translocation and release into the bloodstream.

Survival in the human digestive tract and regulation of virulence genes are key factors for bacterial pathogenesis but to date few data are available due to lack of relevant models. Several studies have shown that specific gastrointestinal parameters may influence the expression of EHEC virulence factors (Barnett Foster 2013). For instance, exposure to gastric acid pH can trigger induction of specific virulence genes that are associated with adhesion, mobility, or type III secretion, while bile treatment has been shown to downregulate stx2 gene expression (Kus et al. 2011). Recently, E. coli O157:H7 survival was evaluated using dynamic in vitro systems which physiologically reproduce the luminal conditions of the human stomach and small intestine (Etienne-Mesmin et al. 2011a; Miszczycha et al. 2014) or large intestine. Bacterial mortality was observed in the stomach and duodenum while, in contrast, bacteria are able to grow in the distal parts of the small intestine. In the large intestine, E. coli O157:H7 was progressively eliminated and the authors showed that the pathogen did not modify the major population of gut microbiota when the in vitro colonic model was inoculated with the feces from an unique male volunteer. However, recent studies tend to indicate that gut microbiota and its metabolites may play a key role in the outcome of EHEC infection. Using the cecal content of human microbiota-associated rats as a culture medium for EHEC, de Sablet et al. (2009) have shown that soluble factors secreted by Bacteroides thetaiotaomicron can repress Stx synthesis in E. coli O157:H7. On the other side, colicins produced by colicinogenic bacteria can increase Stx production (Toshima et al. 2007). Bifidobacteria can also inhibit translocation of Stx from the gut lumen to the blood through production of acetate, one of the main short-chain fatty acid (SCFA) (Fukuda et al. 2011). Lastly, high concentrations of SCFAs inhibit EHEC's growth, whereas low butyrate concentrations are able to enhance the expression of virulence genes involved in pathogen motility and adhesion as well as in the induction of A/E lesions (Nakanishi et al. 2009; Tobe et al. 2011).

As of now, there is no treatment available for EHEC infection and the use of conventional antibiotics may exacerbate

Stx-mediated cytotoxicity (Scheiring et al. 2010). There is a growing interest in developing new alternatives to control EHEC infection, such as the use of probiotics. Probiotics are defined as live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host (FAO/ WHO 2002). Among the available probiotic strains, Saccharomyces cerevisiae var. boulardii (Saccharomyces boulardii) is a thermophilic nonpathogenic yeast, administered in western Europe for the prevention and treatment of a variety of diarrheal diseases, that has already shown beneficial effects in the control of EHEC infection. Dahan et al. (2003) have demonstrated that preincubation of T84 intestinal cells with S. boulardii inhibits proinflammatory signaling pathways induced by the pathogen. Using an in vitro model of the human gastrointestinal tract, Etienne-Mesmin et al. (2011a) have shown that another probiotic strain from the genus Saccharomyces (S. cerevisiae CNCM I-3856) significantly decreases EHEC O157:H7 growth resumption in the distal parts of the small intestine, when coadministered with the pathogen. In the ARCOL (Artificial Colon), an in vitro model of the human large intestine, the co-administration of this probiotic yeast strain and E. coli O157:H7 has no effect on pathogen viability but leads to a significant increase in acetate production (Thévenot et al. 2013).

The aim of the present study was to investigate in simulated human colonic environment the effects of a prophylactic (and not a curative) treatment with *S. cerevisiae* CNCM I-3856 on EHEC 0157:H7, using the ARCOL model inoculated with the feces from three different healthy volunteers, a female and two males. The influence of the probiotic treatment on EHEC survival and virulence was assessed, as well as the effect of the pathogen and/or the probiotic on the main populations of gut microbiota. Complementary in vivo assays using murine ileal loops were performed to investigate the effect of the probiotic yeast on EHEC interactions with the intestinal wall.

Materials and methods

Strains and culture conditions

The reference strain EHEC O157:H7 EDL933 used in this study was isolated from Michigan ground beef that was linked to the original 1982 outbreak (ATCC 43895). Bacteria were stored in Luria-Bertani medium containing 15 % glycerol at -80 °C and grown in Luria broth overnight at 37 °C without shaking until stationary phase. The yeast strain *S. cerevisiae* CNCM I-3856 (Lynside Pro GI⁺, Lesaffre Human Care, Milwaukee, WI) was supplied in its active dried powder form and administered in in vitro and in vivo assays resuspended in sterile saline water.

In vitro gastrointestinal digestion

To mimic bacterial transit through the human upper digestive tract, EDL 933 was subjected to a static digestion protocol, before being administered to the ARCOL model or to mice ileal loops. Briefly, the procedure consisted of two successive steps simulating the conditions found in the human stomach and small intestine. Gastric environment was reproduced by addition of 1.8 % (wt./vol.) of porcin pepsin to an aerobic culture of EDL 933 followed by acidification with 1 M HCl to pH 2.5. The gastric phase was performed at 37 °C for 1 h. Intestinal conditions were mimicked by addition of 2 %, 1.6 % and 0.8 % (wt./vol.) of porcine pancreatin, bile salts for microbiology (mixture of sodium cholate and sodium deoxycholate) and bile porcine extract, respectively, followed by alcalinisation with 1 M NaHCO₃ to pH 6.5. The small intestinal phase was performed at 37 °C for 1 h (ileal loops model) or 2 h (ARCOL model). All incubation steps were performed under shaking (60 rpm). After digestion, bacteria were harvested by centrifugation (7000 g, 10 min, room temperature) and resuspended in saline water before inoculation in the ARCOL model or in mice ileal loops (final concentration of 10⁷ CFU/mL).

In vitro fermentation in the ARCOL model

ARCOL is a one-stage fermentation system (Applikon, The Netherlands) that integrates the main parameters of the in vivo human colonic environment (Thévenot et al. 2013; Blanquet-Diot et al. 2012), including pH, temperature, supply of ileal effluents, retention time, anaerobiosis maintained by the sole activity of resident microbiota, and passive absorption of water and fermentation metabolites by dialysis fibers. The bioreactor was inoculated with fresh feces from a healthy individual who had no history of antibiotic treatment 3 months before the study and was used under semi-continuous conditions. The ARCOL model was run under conditions reproducing a healthy human adult colon with a fixed temperature of 37 °C, a controlled constant pH of 6.3, a mean retention time of 36 h, and a redox potential (Eh) of -400 mV. Each fermentation started after a 4-day stabilization phase and was divided into two different 4day phases (A and B). Four experimental schemes were used as follows: (i) none supplementation, (ii) no supplementation in phase A followed by a single administration of E. coli EDL 933 (final concentration of 107 CFU/mL) in phase B, (iii) twice-daily supplementation with physiological doses of S. cerevisiae CNCM-I 3856 (final concentration of 10⁷ CFU/ mL) during the overall experiment, and (iv) a single administration of E. coli EDL 933 in phase B in conjunction with the twicedaily treatment by yeasts. Each condition was made in triplicate using feces collected from three different volunteers (one female and two males, ranging in age from 24 to 46 years). Samples were regularly collected from the colonic medium to determine the survival kinetics of both pathogen and probiotic strains. In addition, the expression of the main virulence genes of EHEC O157:H7 was determined by qRT-PCR: *stx1* and *stx2* encoding for Stx and *eae* encoding for intimin involved in A/E lesions. The main bacterial populations of human gut microbiota were followed by qPCR. Dialysis outflow of the ARCOL model was daily sampled to determine SCFA production by gas chromatography.

Mice ileal loops assay

Seven weeks-old sex-matched littermates FVB/c mice were separated into two groups. Mice were orally inoculated once daily during 7 days either with saline water ("control" group, n = 28) or with approximatively 2.10⁶ CFU of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 ("Sc" group, n = 26). Mice were weighted prior to the first inoculation and daily thereafter.

Mice ileal loops assay were carried out on day 8, as previously described by Hitotsubashi et al. (1992). Briefly, mice were anesthetized and the abdominal cavity was opened. A 6cm ileal segment with two to three PPs was isolated by suturing two ends of the segment, and a suspension of EDL 933 (10⁷ CFU/mL) was injected into the ileal loops ("O157:H7" group). The small intestine was then placed back into the abdominal cavity which was closed with sutures. After 5 h, mice were sacrified by cervical dislocation according to animal care procedure. The PPs and an equivalent surface of mucosa into the loops were excised to determine the number of associated bacteria, and each PP was macroscopically examined to define its hemorrhagic status. In addition, keratinocyte-derived chemokine (KC) expression and production were determined using qRT-PCR and ELISA, respectively. Animal protocols used in the study were approved by the committee for ethical issues, CEMEA Auvergne (Agreement to Nicolas Barnich, CEMEA CE16-09, Clermont-Ferrand, France).

Survival kinetics of probiotic and pathogen in vitro and intracellular bacteria in vivo

The survival kinetic of EDL933 was determined in the ARCOL model by qPCR analysis using stx primers (Table 1) as described by Bonnet et al. (1998) and Carey et al. (2008). qPCR reactions contained 1X SYBR mix (Agilent Technologies, Massy, France), 0.2 µM of each primer (VT1c and VT1d), 10 ng of DNA and water to 10 µL. Genomic DNA from E. coli O157:H7 (standardized to 10 ng/µL) was serially diluted (undiluted, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) and used as a reference. Amplifications conditions consisted of 1 cycle at 94 °C for 3 min followed by 35 cycles of 94 °C for 45 s, 60 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min. A final extension step of 10 min at 72 °C was included. Following threshold-dependent cycling, melting was performed from 60 to 95 °C at 0.1 °C/s melt rates. The survival of S. cerevisiae CNCM I-3856 was determined both in vitro during the fermentations and in vivo in mice stools by plating on Sabouraud dextrose agar supplemented with

Name	Sequence 5'-3'	Target	Annealing temp (°C)	References			
SYBR green							
36B4-F	TCCAGGCTTTGGGCATCA	36B4 mouse telomere	56	Nguyen et al. (2014)			
36B4-R	CTTTATCAGCTAGCACATCACTCAGA		50.9				
KC-F	TTGTGCGAAAAGAAGTGCAG	Mouse keratinocyte- derived-chemokine	58	Nguyen et al. (2014)			
KC-R	TACAAACACAGCCTCCCACA		60				
eaeA-F eaeA-R	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC CCCGAATCCGTCTCGCCAGTATTCG	EHEC intimin	60	Medellin-Peña et al. (2007)			
VT1c VT1d	ACCCTGTAACGAAGTTTGCG ATCTCATGCGACTACTTGAC	EHEC Shiga-toxin 1	60	Bonnet et al. (1998)			
Stx2-F Stx2-R	TTGCTGTGGATATACGAGGGC TCCGTTGTCATGGAAACCG	EHEC Shiga-toxin 2	60	Carey et al. (2008)			
BAC338F BAC516F	ACTCCTACGGGAGGCAG GTATTACCGCGGCTGCTG	Total bacteria	58	Yu et al. (2005)			
789cfbF cfb967R	CRAACAGGATTAGATACCCT GGTAAGGTTCCTCGCGTAT	Bacteroidetes	61	Bacchetti De Gregoris et al. (2011)			
Act920F3 Act1200R	TACGGCCGCAAGGCTA TCRTCCCCACCTTCCTCCG	Actinobacteria	61	Bacchetti De Gregoris et al. (2011)			
928F-Firm 1040FirmR	TGAAACTYAAAGGAATTGACG ACCATGCACCACCTGTC	Firmicutes	61	Bacchetti De Gregoris et al. (2011)			
Eco1457F Eco1652R	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	Enterobacteriaceae	63	Bartosch et al. (2004)			
F_Lacto05	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	Lactobacillus/Pediococcus/ Leuconostoc	60	Furet et al. (2009)			
R_Lacto04	CGCCACTGGTGTCTYTCCATATA						
TaqMan							
F_Bact 1369	CGGTGAATACGTTCCCGG						
P_TM1389F R_Prok1492R	FAM-CTTGTACACACCGCCCGTC-TAMRA TACGGCTACCTTGTTACGACTT	Total bacteria	60	Furet et al. (2009)			
E. coli-F	CATGCCGCGTGTATGAAGAA						
E. coli-P	FAM-TATTAACTTTACTCCCTTCC TCCCCGCTGAA-TAMRA CGGGTAACGTCAATGAGCAAA	Escherichia coli	60	Huijsdens et al. (2002)			
E. Bifid 09c	CGGGTGAGTAATGCGTGACC						
P_Bifid B_Bifid 06	FAM-CTCCTGGAAACGGGTG-TAMRA	Bifidobacteria	60	Furet et al. (2009)			
F Bacter 11	CCTWCGATGGATAGGGGTT						
P_Bac303 R_Bacter 08	YY-AAGGTCCCCCACATTG-TAMRA CACGCTACTTGGCTGGTTCAG	Bacteroides/Prevotella	60	Furet et al. (2009)			

Table 1 Primer and probe sequences used in qPCR and RT-qPCR assays

gentamicin (10 μ g/L) and chloramphenicol (50 μ g/L) followed by incubation at 37 °C during 48 h.

Survival rates in the ARCOL model were assessed by comparing the profiles obtained for the pathogen and the probiotic with that of a theoretical marker which simulates the behavior of an inert (i.e., non degraded and non absorbed) compound (Danckwerts 1953).

In order to evaluate the number of intracellular bacteria, mouse tissue samples were incubated with Roswell Park Memorial Institute medium containing 100 μ g/mL of gentamicin for 1 h at 37 °C. Tissues were washed, homogenized in phosphate-buffered saline containing 0.1 % Triton X-100, and plated onto Luria Broth agar medium (37 °C, 24 h).

Gene expression analysis

qRT-PCR was used to follow the expression of specific genes from EDL 933 and epithelial cells: *stx* and *eae* in the ARCOL model and mouse keratinocyte-derived-chemokine (*KC*) gene in mice ileal loops. Total RNA was extracted from mouse tissue samples using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to manufacturer's instructions and from in vitro colonic medium using phenol-chloroform. Then, RNAs were reversely transcribed using the first-strand cDNA synthesis kit (Takara, Shiga, Japan) to quantify mRNA expression levels. qRT-PCR was performed using SYBR Green qPCR Master Mix (Roche, Bâle, Swiss) on a Stratagene Mx3005P QPCR system (Agilent Technologies, Massy, France) with the specific primers indicated in Table 1. *Enterobacteriaceae* 16S and mouse 36B4 were used as internal controls for quantification of mRNA expression. Fold-induction was calculated using the Ct method as follows:.

$$\begin{split} \Delta\Delta Ct &= \left(Ct_{target \ gene} - Ct_{housekeeping \ gene}\right)_{treatment} \\ &- \left(Ct_{target \ gene} - Ct_{housekeeping \ gene}\right)_{non \ treatment} \end{split}$$

and the final data were derived from $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

KC gene expression analysis was completed by the measurement of the corresponding protein. The amount of KC secreted in the supernatants from mouse ileal tissues (cultured for 24 h in Roswell Park Memorial Institute medium supplemented with 100 µg/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 100 µg/mL gentamicin in an atmosphere containing 5 % CO₂ at 37 °C) was determined by ELISA (R&D systems, Norwich, England) according to the manufacturer's instructions.

Composition and metabolic activity of human gut microbiota

The main bacterial populations of human gut microbiota (total bacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Bifidobacteria, Bacteroides, Enterobacteriaceae, Lactococcus/ Pediococcus/Leuconostoc, E. coli, Faecalibacterium prausnitzii) were followed in the ARCOL model by qPCR analysis as previously described by Thévenot et al. (2013). Primers used in this study are listed in Table 1. SCFAs production in the ARCOL model was determined by gas chromatography. Dialysis outflows supplemented with internal standard (2-ethyl butyric acid at 49 mM) were deproteinized by addition of satured phosphotungstic acid (500 g/L), centrifuged at 9000g for 20 min before supernatants were filtered (0.45 μ m). The samples were run through a Agilent 6890 Series GC System (Agilent Technologies, Massy, France) fitted with HP-INOWax column (0.25 mm \times 30 m \times 0.25 μ m) and flame ionization detector. Helium was used a carrier gas at a flow rate of 2 mL/min. Injector and detector were set at 250 °C. The column was maintained in an oven with a temperature gradient ranging from 110 to 240 °C. One microliter quantity of each sample was injected with a run time of 14.3 min. Peaks were integrated using the HP ChemStation software. SCFA concentrations were quantified by comparing their peak areas with the corresponding standards.

Histological analysis

Tissue samples taken from the mouse small intestine (control, O157:H7 and "O157:H7 + Sc" groups) were fixed in PBS containing 4 % formalin, paraffin-embedded, cut into 5-µm slices, stained with hematoxylin/eosin/safranin, and then

examined with a light microscope by a pathologist kept unaware of sample origin.

Statistical analysis

For each microorganism, significant differences in survival between treatments and time points were tested using a nonparametric analysis of repeated measures (the same individuals were measured over time) with the "fl.ld.fl" function of the R package "nparLD" (Noguchi et al. 2012) in R 3.0.0 (R Development Core Team 2012). In case of a significant treatment or interaction effect, Tukey contrast effects of survival between the four treatments for each time point were calculated using the function "nparcomp" of the R package nparcomp (Konietschke 2012). The same method was applied on SCFA data analysis. Percentage variations in SCFA production between phase A and B in ARCOL and effects of treatments in the in vivo assay were determined by Mann-Whitney test, and P < 0.05 was considered as significant. The kinetics of virulence gene expression were tested with the "ld.fl" function of the R package nparLD. In case of a significant time effect, pairwise comparisons with Bonferroni adjustment were performed. The independence between treatment and hemorrhagic status of PPs was tested by chi-square with Yates' correction. The agglomerative hierarchical clustering with the "hclust" function was used to cluster treatment depending on their composition in major bacterial populations (Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroides, Lactococcus/Pediococcus/Leuconostoc, Enterobacteriaceae).

Results

Yeast viability in the in vitro colonic environment

S. cerevisiae CNCM I-3856 viability was followed during in vitro fermentations in the ARCOL model. Following each injection, viable yeast concentrations immediately reached peak level around 7 $\text{Log}_{10}/\text{mL}$ but this level was not maintained in the fermentative medium until the next administration, despite a twice-daily supplementation (Fig. S1). Indeed, following injections, yeasts were quickly cleared from the bioreactor: 6 h following each morning inoculation, $3.3 \pm 0.5 \text{ Log}_{10}$ CFU/mL (n = 3) were found, except for the first injection where $6.5 \pm 0.2 \text{ Log}_{10}$ CFU/mL (n = 3) were maintained. Yeast survival was not modified by the addition of *E. coli* O157:H7.

Effect of prophylatic treatment with *S. cerevisiae* on EHEC O157:H7 survival and virulence

E. coli O157:H7 was progressively eliminated from the bioreactor, more rapidly than the theoretical transit marker, showing that the pathogen was not able to maintain in the simulated
human colonic conditions (Fig. 1A). After a 36-h period of fermentation, $6.3 \pm 4.8 \%$ (*n* = 3) of initial bacteria was recovered in the bioreactor versus 35.1 ± 0.8 % (n = 3) for the transit marker (P < 0.05). The elimination rate of *E. coli* O157:H7 in the ARCOL (Fig. 1A) was not modified by the twice-daily supplementation with S. cerevisiae CNCM I-3856. The expression of EHEC main virulence genes, stx1, stx2 and eae, was followed in the colonic environment at different times post administration (Fig. 1B). Expression levels of stx1, stx2, and eae were significantly increased (P < 0.05) compared to the initial time point, until 12 h post administration for stx1 and stx2 and 9 h for eae. The highest levels were obtained at 12 h post administration for stx1 (9-fold upregulated) and at 6 h for stx2 and eae (3- and 2.8-fold, respectively). Prophylactic treatment with the probiotic yeast significantly (P < 0.05) decreased stx1 and stx2 gene expression compared to non-treated conditions, 9 and 12 h after EHEC administration (Fig. 1B). In contrast, eae expression was not influenced by the probiotic S. cerevisiae.

E. coli O157:H7 and *S. cerevisiae* have individual-dependent effects on human gut microbiota

The major phyla of gut microbiota and their main members were quantified in the ARCOL model by qPCR using 16S rRNA-targeted oligonucleotide-specific primers (Fig. S2). Bacterial concentrations were normalized with respect to the amount found on the last day of the stabilization phase. Regardless of the treatment, no significant change was observed in the levels of the selected populations. To further investigate the effect of pathogen and probiotic supplementation on each individual's gut microbiota, an agglomerative hierarchical clustering on the major phyla and genus (Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroides, Lactococcus/Pediococcus/ Leuconostoc, Enterobacteriaceae) was used to gather the data (Fig. 2). Irrespectively of the stool donors, all control samples (no treatment) were found in the same cluster. Conversely, the effect of either the pathogen or the probiotic (when administered together or separately) on gut microbiota varied from one subject to another. The resulting heat map of clustering shows the individual variations in response to the different treatments. For example, EHEC infection led to an increase in Lactococcus/ Pediococcus/Leuconostoc genus in donors 2 and 3 but a decrease in donor 1 compared to control group. Also in donor 3, when EHEC was administered, prophylactic yeast treatment led to a decrease in Enterobacteriaceae, whereas in donor 1, yeast treatment led to a decrease in Bacteroidetes.

Prophylactic treatment with *S. cerevisiae* beneficially modulates gut microbiota activity during EHEC infection

To further investigate the effects of both pathogen and probiotic on colonic microbiota, the microbiota's metabolic activity was daily followed by assessing the production of major and

Fig. 1 Influence of S. cerevisiae CNCM I-3856 on E. coli O157:H7► survival and virulence in human simulated colonic conditions. EHEC survival and virulence were assessed during in vitro fermentations in the ARCOL model after a single administration of E. coli O157:H7 EDL 933 (10 CFU/mL) in conjunction or not with twice-daily treatment by probiotic yeasts (10 CFU/mL). A The curves obtained for bacteria alone (black line, "O157:H7") or when S. cerevisiae was administered as a prophylactic treatment (dashed line, "O157:H7 + Sc") were compared to that of a theoretical transit marker (Danckwerts 1953) which simulates the behavior of an inert compound (dotted line, "transit marker"). Results are expressed as mean percentages of initial intake \pm standard deviations (n = 3 for O157:H7, n = 3 for "O157:H7 + Sc," n = 6 for the theoreticaltransit marker). B Total RNAs were extracted from the in vitro colonic medium with (gray bar) or without (black bar) the prophylactic yeast treatment, and stx1 (a), stx2 (b), and eae (c) mRNAs were quantified by qRT-PCR. Housekeeping 16S Enterobacteriaceae was used as an internal standard to normalize the data. Results are expressed as means of foldinduction (calculated using the Ct method with time 0 as reference) \pm standard deviations (n = 3). Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney test. Statistically different from t0 "0 h" at P < 0.5 (α), P < 0.01 (β), P < 0.001 (γ). O157:H7 statistically different from O157:H7 + Sc at P < 0.05 (*) or P < 0.01 (**). Vertical dashed lines separated the first 12 hours to others

minor SCFAs in the dialysis outflows of the ARCOL model. Data were grouped and analyzed per experimental phase (phase A or B, as defined in the material and method section). Whatever the treatment, acetate is the main metabolite produced, then followed by propionate and butyrate (Table 2). In the control conditions, the percentages of acetate, propionate, and butyrate in dialysis outflows were 66, 18, and 16 % of major SCFA, respectively. To evaluate the influence of EHEC administration on colonic microbiota activity, with or without preventive yeast treatment, the variation in SCFA production between phase B and phase A was calculated in both cases (Fig. 3). The administration of E. coli O157:H7 did not induce major modification of SCFA production compared to control experimentation (Fig. 3a). In contrast, the production of acetate was significantly increased when EHEC O157:H7 was administrated after a preventive yeast treatment, compared with yeast treatment without EHEC infection (5.0 ± 3.9 versus -1.2 ± 1.3 %, P < 0.05, n = 3) and that of butyrate significantly decreased $(-3.3 \pm 4.4 \text{ versus } -1.9 \pm 1 \%, P < 0.05, n = 3)$ (Fig. 3b). The administration of EHEC in conjunction with yeast treatment also led to a significant decrease in minor SCFA production (branched-SCFA and valerate; P < 0.05).

Prophylactic treatment with *S. cerevisiae* inhibits EHEC O157:H7 interactions with ileal murine Peyer's patches and subsequent PPs bleeding

To further explore the effect of probiotic yeasts and investigate their action on EHEC interactions with the intestinal wall in vivo, *S. cerevisiae* CNCM I-3856 was orally administrated to mice for 7 days. At the end of probiotic treatment, body weights were determined and compared to that of the control group (saline water). The



body weight of mice after 7 days in the S. cerevisiae group $(23.7 \pm 2.7 \text{ g}, n = 26)$ was not significantly

different from that of the control group (24.0 \pm 2.7 g, n = 28) (Fig. 4A). The mean fecal *S. cerevisiae* count in



Fig. 2 Clustering of the q-PCR analysis of gut microbiota in the ARCOL model. Heat map analysis of the main bacterial population concentrations (qPCR analysis) under various tested conditions (control, "Sc," "O157:H7," "O157:H7 + Sc") was used to cluster data. Seven major phyla or genus were followed to clustering: Actinobacteria, Bacteroides,

Bacteroidetes, Enterobacteriaceae, Firmicutes, and Lactococcus/ Pediococcus/Leuconostoc. Heat map coloring refers to the concentration value: high values are represented in green whereas low values are in red. D1, D2, and D3 are donor 1, donor 2, and donor 3, respectively. Days of fermentations are indicated by J

the treated group was approximately 4 Log₁₀ CFU/g of feces during the 7 days (Fig. 4B). As expected, no yeast was found in the control animals.

The effect of S. cerevisiae CNCM I-3856 on EHEC interactions with intestinal mucosa with or without PPs was investigated using a mice ileal loops assay (Fig. 4D). In the O157:H7 group, the number of intracellular bacteria was significantly (P < 0.05) higher in ileal tissue with PPs $(4.1 \pm 2.4 \text{ Log}_{10})$ CFU/g of ileal tissue) compared to ileal mucosa without PPs $(2.6 \pm 1.7 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g})$. Interaction of EHEC with murine ileal

1.00

mucosa without PPs was not influenced by the probiotic treatment. In contrast, the mean number of bacteria that interacted with ileal mucosa with PPs was significantly (P < 0.001) decreased with the probiotic treatment $(1.7 \pm 1.9 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g of})$ ileal tissue in the O157:H7 + Sc group versus $4.1 \pm 2.4 \text{ Log}_{10}$ CFU/g in the O157:H7 group). Bloodshot PPs were macroscopically observed following EHEC infection (Fig. 4D). Pretreatment with yeast significantly (P < 0.01) reduced the number of hemorrhagic PPs, 66 % of total PPs being hemorrhagic in the O157:H7 group versus 26 % O157:H7 + Sc group (Fig. 4D).

Influence of EHEC and probiotic S. cerevisiae on SCFA production in the ARCOL model Table 2 h

SCFA"	% during the different phases ⁶								
	Control ^c		Treatment 1 ^d		Treatment 2 ^e		Treatment 3 ^f		
	Phase A	Phase B	Phase A	Phase B	Phase A	Phase B	Phase A	Phase B	
Acetate	66.1 ± 2.6	68.5 ± 2.5	67.4 ± 3.2	66.2 ± 2.6	69.0 ± 3.7	68.9 ± 2.3	63.7 ± 8.5	68.7 ± 5.3	
Propionate	18.4 ± 2.0	17.1 ± 1.8	18.7 ± 2.4	18.0 ± 2.4	17.2 ± 1.4	17.0 ± 1.8	19.7 ± 3.6	18.0 ± 4.0	
Butyrate	15.9 ± 1.2	14.4 ± 1.5	13.9 ± 1.8	15.8 ± 1.0	13.9 ± 2.5	14.1 ± 1.4	16.6 ± 5.0	13.3 ± 1.9	
iso-Butyrate	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.1	2.3 ± 0.1	1.9 ± 0.6	2.3 ± 0.3	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.2	
iso-Valerate	2.8 ± 0.2	2.9 ± 0.3	2.9 ± 0.3	3.2 ± 0.3	2.5 ± 0.6	2.6 ± 0.5	2.0 ± 0.5	1.9 ± 0.4	
Valerate	4.6 ± 0.6	4.5 ± 0.6	4.6 ± 0.6	5.2 ± 0.5	6.2 ± 1.4	5.8 ± 1.0	5.7 ± 0.8	5.2 ± 0.8	
Hexanoic acid	3.1 ± 0.6	3.0 ± 0.5	2.7 ± 1.6	4.0 ± 1.0	5.1 ± 2.2	4.6 ± 1.3	3.5 ± 2.7	3.4 ± 2.5	
Heptanoic acid	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.4	0.5 ± 0.5	0.9 ± 0.4	2.3 ± 1.7	2.0 ± 1.7	2.0 ± 1.6	1.9 ± 1.4	

 a SCFA in the dialysis outflows were measured by gas chromatography. Data are mean percentages \pm standard deviations for the 4 days of each phase (n = 12 for phases A and B)

^b Defined as the percentage of each SCFA compared to the sum of acetate, propionate, and butyrate

^c Control refers to no treatment

^d A twice-daily supplementation with S. cerevisiae CNCM I-3856 in phases A and B

^e A single administration of *E. coli* EDL 933 the first day of phase B

^f A twice-daily supplementation with S. cerevisiae CNCM I-3856 in phases A and B in conjunction with a single administration of E. coli EDL 933 the first day of phase B

aanu

Fig. 3 Effect of S. cerevisiae CNCM I-3856 and E. coli O157:H7 on SCFA production in the ARCOL model. SCFAs produced during in vitro fermentations were measured in the dialysis outflows of the ARCOL model by gas chromatography, when E. coli O157:H7 EDL 933 was administered alone (a) or with the prophylactic yeast treatment (b). Data were grouped and analyzed per experimental phase (phase a or b) and are expressed as mean percentages of variations between phase A and B (n = 3). Boxes, lines, and whiskers denote interquartile ranges, medians, and 25th and 75th percentiles, respectively. Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney test. "O157:H7" statistically different from "O157:H7 + Sc" at P < 0.05 (*)



Histological analysis was performed on ileal loops from control, O157:H7, and O157:H7 + Sc groups after a 5-h EHEC challenge. Microvilli on the ileum section of the S. cerevisiae-fed mice were less atrophied than that of the O157:H7-treated mice (Fig. 4E). EHEC infection in human is associated with an increase in the production of the proinflammatory IL-8 (Bellmeyer et al. 2009). To investigate the potential immunomodulatory effect of S. cerevisiae, the proinflammatory keratinocyte-derived chemokine (KC) expression and production levels were measured in the three groups of mice. The results showed that S. cerevisiae CNCM I-3856 did not significantly influence KC expression and production, with mean protein concentrations of 679 ± 2680 pg/mL in the O157:H7 + Sc group versus 1603 ± 6006 pg/mL in the O157:H7 group (Fig. 4F).

Discussion

EHEC are major foodborne pathogens which cause considerable public health concerns. As the treatment of EHEC infection is only supportive and antibiotic therapy remains controversial, probiotics are being investigated as an alternative strategy. To date, most of the studies that have investigated EHEC or probiotic behavior in human digestive conditions have been conducted either in oversimplified static in vitro



models or in cell culture assays that integrate only selective parameters of the human digestive tract, or in mice models whose physiological conditions remain far from those observed in humans. In addition, in the vast majority of cases, the studies investigating EHEC behavior in the digestive environment (Barnett Foster 2013) do not take into account the gut microbiota, which is a critical parameter of the human gut homeostasis, and the molecular and cellular mechanisms by which probiotics can affect the survival and virulence of EHEC remain largely unknown.

Here, we aimed to (i) better understand EHEC O157:H7 survival, virulence, and interactions with gut microbiota in the

human colonic environment using the dynamic in vitro model ARCOL inoculated with feces from different healthy volunteers and (ii) investigate the antagonistic effect of *S. cerevisiae* CNCM I-3856 against the pathogen when administered as a prophylactic treatment, using complementary in vitro (simulated human colonic conditions) and in vivo (mouse ileal loops) approaches. In this study, we chose to use a prophylactic strategy, as previous studies by Dahan et al. (2003) and Dalmasso et al. (2006) with the well-known probiotic yeast *S. boulardii* showed that preincubation, but not coincubation, of EHEC-infected T84 cells with the probiotic decreased IL-8 secretion and TNF- α induced apoptosis. ✓ Fig. 4 Effect of S. cerevisiae CNCM I-3856 on EHEC interactions with mice Peyer's patches. S. cerevisiae CNCM I-3856 was orally administrated to mice (2.10⁶ CFU/mouse/day) during 7 days ("Sc" group). As a control, saline water was given to the animals using the same experimental protocol ("control" group). On day 8, mice ileal loops were performed and inoculated with a suspension of E. coli O157:H7 EDL 933 (107 CFU/mL) to study pathogen interaction with murine mucosa ("O157:H7" or "O157:H7 + Sc" groups). A Mice body weight (in grams (g), means \pm standard deviations, n = 28 for control and n = 26 for Sc) was daily determined. **B** Viable yeasts were numered in mice feces (in Log_{10} CFU per g of feces, means ± standard deviations, n = 28 for control and n = 26 for Sc). C The number of intracellular EHEC O157:H7 was determined in mouse ileal mucosa without ("ileal mucosa") or with Peyer's Patches ("Peyer's Patches") when the probiotic yeast was administered (O157:H7 + Sc) or not (O157:H7). Results are expressed as Log_{10} CFU per gram of ileal tissue (n = 23 for O157:H7 and n = 26 for O157:H7 + Sc). Horizontal line represents the median. Statistical significance between treatments was indicated (P < 0.05 (*), P < 0.001(***), NS non-significant). D Macroscopic view of non hemorrhagic (upper panel) and hemorrhagic (below panel) murine Peyer's patches. The number of hemorrhagic Peyer's patches (expressed as percentages of the total number of Peyer's patches) was determined in the O157:H7 and O157:H7 + Sc groups. Significant differences are indicated (*P < 0.01). e Stained cross-sections of mouse ileum were performed after ileal loops assay in the O157:H7 (a and b) and O157:H7 + Sc (c and d) groups. Black arrows indicate different sizes of microvilli. f Keratinocyte-derived chemokine (KC) expression and production were determined at the end of ileal loops assay, using qRT-PCR and ELISA, respectively, in the control, O157:H7, and O157:H7 + Sc groups. Means are represented by *horizontal lines* (n = 5 for control, n = 23 for O157:H7, and n = 26 for O157:H7 + Sc). a KC mRNA expression levels (in fold changes). b Amount of KC secreted in picogram per gram of ileal tissue

The first aim of the study was to follow EHEC survival in the in vitro human colonic environment as well as the influence of a prophylactic treatment with S. cerevisiae CNCM I-3856. A progressive elimination of EHEC O157:H7 from the ARCOL model was observed, most likely due to either the barrier effect of gut microbiota or to the high SCFA concentrations found in the colon which are known to inhibit EHEC growth (Nakanishi et al. 2009; Tobe et al. 2011). Results obtained in the current investigation with the stools obtained from three different donors (two males and one female ranging in age from 24 to 46 years) corroborate those previously obtained with a unique male donor (Thévenot et al. 2013), suggesting that such survival kinetics may be generalized to the adult population. Similar trends are observed in mouse model where large inocula (10¹⁰ CFU) and antibiotic treatment disrupting commensal microbiota are required for effective colonization by EHEC strains (Naylor et al. 2005). In humans, Tarr et al. (1990) showed that 4 to 6 days after the beginning of digestive disorders, no viable EHEC could be detected in the feces of HUS patients, which corroborates with our in vitro results. In rare cases and mainly in young children, prolonged shedding could be observed (Swerdlow and Griffin, 1997). Our results indicate that high EHEC levels in the feces would be rather linked to a growth renewal of the pathogen in the distal parts of the intestine (Etienne-Mesmin et al. 2011a; Miszczycha et al. 2014) than to its ability to grow in the colon. Further investigations aiming to assess the survival kinetics of EHEC in the large intestinal conditions of at-risk population (children under 5 years old and elderly people) would be of great interest. Unfortunately, pro-phylactic treatment with *S. cerevisiae* CNCM I-3856 had no direct antagonistic effect on EHEC O157:H7 survival in the colonic environment.

To date, no data is available regarding EHEC virulence factor expression in human large-intestinal conditions. For the first time, we showed that stx and eae expressions, which are the two main genes involved in EHEC pathogenesis (encoding for Stx and the adhesin intimin, respectively), were increased in the ARCOL model until 12 h post administration. This means that expression of bacterial adhesins can be upregulated even if the pathogen does not come into contact with host cells and that the microenvironment of the colonic lumen may act as a cue for virulence modulation required for EHEC infection process. Among the metabolites found in the human colonic environment, SCFAs have already shown their ability to regulate expression of virulence genes involved in motility, adhesion, and induction of A/E lesions (Barnett Foster 2013). In particular, high concentrations of SCFAs that are typically found in the colon were previously associated with increased expression of the Iha adhesin encoding gene (Herold et al. 2009). Interestingly, we found that the prophylactic treatment with S. cerevisiae significantly decreased stx1 and stx2 expression. Hitherto, downregulation of stx expression was only described with probiotic bacteria and linked to the production of organic acids and the subsequent fall in pH (Carey et al. 2008). This is therefore the first report showing the antagonistic effect of a probiotic yeast on stx expression. This outcome is particularly important as Stx are responsible for serious complications in EHEC infection.

As our results suggested that gut microbiota may have a key role in the modulation of EHEC virulence program, we further investigated the effect of both pathogen and probiotic supplementation on gut microbiota composition and activity. Each treatment was tested in triplicate using fresh feces collected from three healthy volunteers. In the control samples (no pathogen nor probiotic treatment), the gut microbiota profiles were similar for the three volunteers. In contrast, when E. coli O157:H7 or S. cerevisiae CNCM I-3856 were administered, the profiles became different depending on the volunteer, suggesting that EHEC and probiotic yeast have individual-dependent effects. This finding strengthens the emerging view that commensal microbiota may influence the clinical course of EHEC (de Sablet et al. 2009; Toshima et al. 2007). The gut microbiota activity was then followed by assessing the production of major and minor SCFAs, which are main microbial metabolite. EHEC infection by itself had no major effect on SCFA production. By contrast, when a prophylactic treatment with the probiotic S. cerevisiae was applied, a significant increase in the production of acetate, associated with a significant decrease in butyrate, was observed. In mice, acetate production by *Bifidobacterium* strains was associated with an anti-infectious activity through the inhibition of Stx production and translocation (Fukuda et al. 2011). Butyrate has well-known beneficial properties that are essential to maintain gastrointestinal health, providing energy to epithelial cells, maintaining gut barrier function, reducing oxidative stress, and inhibiting inflammation and carcinogenesis (Hamer et al. 2008). However, butyrate has been shown to enhance the expression of virulence-associated genes in EHEC, particularly those localized on LEE cluster and mobility genes (Nakanishi et al. 2009; Tobe et al. 2011). Taken together, these results suggest that, during EHEC infection, a prophylactic treatment with the probiotic *S. cerevisiae* CNCM I-3856 can beneficially modulate gut microbiota activity.

Besides their antagonistic effect on pathogen growth or virulence factor expression, probiotics can also counteract the adverse effects of EHEC bacteria by limiting pathogen attachment to the host (Hsueh et al. 2010; Hugo et al. 2008; Medellin-Peña and Griffiths 2009; Rund et al. 2013; Turková et al. 2013) or by enhancing intestinal barrier function (Fukuda et al. 2011; Johnson-Henry et al. 2008; Putaala et al. 2008). The last aim of the present study was to investigate the effect of a pre-challenge feeding with the probiotic S. cerevisiae CNCM I-3856 on E. coli O157:H7 interactions with the murine ileal mucosa and particularly with PPs. Our in vivo ileal loop assays confirmed that EHEC O157:H7 specifically targets PPs, as previously described by Phillips et al. (2000), and subsequently induces hemorrhagic lesions, probably due to the action of Stx (Etienne-Mesmin et al. 2011b). For the first time, we showed that a prophylactic treatment with the probiotic strain S. cerevisiae CNCM I-3856 significantly reduced both the amount of associated bacteria and the number of hemorrhagic PPs. Mechanisms by which EHEC preferentially targets PPs and consequently the way how probiotic yeast may exert its antagonistic effect are still unknown. However, Sun et al. (2010) have shown that Lactobacillus acidophilus FN001 has mannose-specific proteins on its surface that mediate its adhesion to the mice PPs and could inhibit the adhesion of E. coli ATCC25922, which also contains mannose-specific lectin. In addition, Tiago et al. (2012) have highlighted that several enteropathogenic bacteria, such as E. coli or Salmonella enterica serovar Typhimurium, can adhere to the surface of S. boulardii, S. cerevisiae UFMG 905, and S. cerevisiae BY4741 and can be therefore captured by the yeasts. Such binding led to a decrease in S. enterica serovar Typhimurium translocation in mice (Martins et al. 2007, 2013). We therefore hypothesize that, without probiotic treatment, EHEC tropism to PPs results from their binding to specific carbohydrates, such as mannose, on the cell surface. When a prophylactic treatment with S. cerevisiae is administered, yeast surfaces which are rich in mannose could act as a trap binding EHEC, leading to a decrease in the number of bacteria associated with PPs and consequently to a lower amount of Stx able to induce hemorrhagic lesions. *S. cerevisiae* may also act directly by inhibiting Stx translocation or by downregulating Stx expression, as shown in vitro in the ARCOL model.

In conclusion, this study provides significant insight into EHEC pathogenesis by showing, in human simulated colonic environment, the upregulation of *stx* and *eae* genes (encoding for two main virulence factors) and the individual-dependent effect of the pathogen on gut microbiota. This finding gives supportive evidence that gut microbiota would play a key role in the clinical outcome of EHEC infection. Even if *S. cerevisiae* CNCM I-3856 does not exert a direct antagonistic effect on *E. coli* O157:H7 survival in the ARCOL model, this probiotic yeast emerges as a useful approach in the fight against EHEC through downregulation of *stx* expression and appropriate modulation of SCFA production. This probiotic strain also specifically inhibits EHEC interactions with PPs in mice ileal loops and prevents their hemorrhagic evolution.

Acknowledgments This work was supported by grants from the French Ministere de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche to J.T. and from Conseil Régional Auvergne (grant CPER T2ANSH ASTERISK, Auvergne STEC Risque) to C.C., EA CIDAM, and UMR INSERM/Université d'Auvergne U1071 USC-INRA 2018. We thank Nourddine Azzaoui for the help in statistical analysis, Pierre Sauvanet and Mathilde Bonnet for the histological analysis, and the Lesaffre Compagny for providing the *S. cerevisiae* CNCM I-3856 strain. We thank Lucie Etienne-Mesmin and Oluwaseyi Adekunle (Institute for Biomedical Sciences, Georgia State University, Atlanta, Georgia) for the critical reading of the manuscript.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

Human and Animal Rights and Informed Consent Animal protocols used in the study were approved by the committee for ethical issues, CEMEA Auvergne (agreement to Nicolas Barnich, CEMEA CE16-09, Clermont-Ferrand, France).

References

- Bacchetti De Gregoris T, Aldred N, Clare AS, Burgess JG (2011) Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. J Microbiol Methods 86:351–356
- Barnett Foster D (2013) Modulation of the enterohemorrhagic *E. coli* virulence program through the human gastrointestinal tract. Virulence 4:315–323
- Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo MET (2004) Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. Appl Environ Microbiol 70:3575–3581
- Bellmeyer A, Cotton C, Kanteti R, Koutsouris A, Viswanathan VK, Hecht G (2009) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* suppresses inflammatory response to cytokines and its own toxin. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 297:G576–G581

- Blanquet-Diot S, Denis S, Chalancon S, Chaira F, Cardot J-M, Alric M (2012) Use of artificial digestive systems to investigate the biopharmaceutical factors influencing the survival of probiotic yeast during gastrointestinal transit in humans. Pharm Res 29:1444–1453
- Bonnet R, Souweine B, Gauthier G, Rich C, Livrelli V, Sirot J, Joly B, Forestier C (1998) Non-O157:H7 Stx2-producing Escherichia coli strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. J Clin Microbiol 36:1777-1780
- Carey CM, Kostrzynska M, Ojha S, Thompson S (2008) The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J Microbiol Methods 73:125–132
- Chong Y, Fitzhenry R, Heuschkel R, Torrente F, Frankel G, Phillips AD (2007) Human intestinal tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7

 initial colonization of terminal ileum and Peyer's patches and minimal colonic adhesion ex vivo. Microbiology 153:794–802
- Dahan S, Dalmasso G, Imbert V, Peyron J-F, Rampal P, Czerucka D (2003) Saccharomyces boulardii interferes with enterohemorrhagic Escherichia coli-induced signaling pathways in T84 cells. Infect Immun 71:766–773
- Dalmasso G, Loubat A, Dahan S, Calle G, Rampal P, Czerucka D (2006) Saccharomyces boulardii prevents TNF-α-induced apoptosis in EHEC-infected T84 cells. Res Microbiol 157:456–465
- Danckwerts PV (1953) Continuous flow systems: distribution of residence times. Chem Eng Sci 2:1–13
- de Sablet T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, Vareille M, Gobert AP, Martin C (2009) Human microbiota-secreted factors inhibit Shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun 77:783–790
- Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Privat M, Denis S, Cardot J-M, Alric M, Blanquet-Diot S (2011a) Effect of a new probiotic Saccharomyces cerevisiae strain on survival of Escherichia coli O157:H7 in a dynamic gastrointestinal model. Appl Environ Microbiol 77:1127–1131
- Etienne-Mesmin L, Chassaing B, Sauvanet P, Denizot J, Blanquet-Diot S, Darfeuille-Michaud A, Pradel N, Livrelli V (2011b) Interactions with M cells and macrophages as key steps in the pathogenesis of enterohemorragic *Escherichia coli* infections. PLoS One 6:e23594
- FAO/WHO (2002) Report of a joint FAO/WHO working group on drafture Organization of the United Nations and World Health Organization London, Ontario, Canada
- Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Topping DL, Suzuki T, Taylor TD, Itoh K, Kikuchi J, Morita H, Hattori M, Ohno H (2011) Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. Nature 469:543–547
- Furet J-P, Firmesse O, Gourmelon M, Bridonneau C, Tap J, Mondot S, Doré J, Corthier G (2009) Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. FEMS Microbiol Ecol 68:351–362
- Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ (2008) Review article: the role of butyrate on colonic function. Aliment Pharmacol Ther 27:104–119
- Herold S, Paton JC, Srimanote P, Paton AW (2009) Differential effects of short-chain fatty acids and iron on expression of iha in Shigatoxigenic *Escherichia coli*. Microbiology 155:3554–3563
- Hitotsubashi S, Fujii Y, Yamanaka H, Okamoto K (1992) Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. Infect Immun 60:4468–4474
- Hsueh H-Y, Yueh P-Y, Yu B, Zhao X, Liu J-R (2010) Expression of Lactobacillus reuteri Pg4 collagen-binding protein gene in Lactobacillus casei ATCC 393 increases its adhesion ability to Caco-2 cells. J Agric Food Chem 58:12182–12191
- Hugo AA, Kakisu E, De Antoni GL, Pérez PF (2008) Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in vitro. Lett Appl Microbiol 46:613–619

- Huijsdens XW, Linskens RK, Mak M, Meuwissen SGM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM (2002) Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. J Clin Microbiol 40:4423–4427
- Johnson-Henry KC, Donato KA, Shen-Tu G, Gordanpour M, Sherman PM (2008) Lactobacillus rhamnosus strain GG prevents enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. Infect Immun 76:1340–1348
- Konietschke F (2012) nparcomp: Perform multiple comparisons and compute simultaneous confidence intervals for the nonparametric relative contrast effects. R package version 2.0
- Kus JV, Gebremedhin A, Dang V, Tran S-L, Serbanescu A, Foster DB (2011) Bile salts induce resistance to polymyxin in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J Bacteriol 193:4509–4515
- Lewis SB, Cook V, Tighe R, Schüller S (2015) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* colonization of human colonic epithelium in vitro and ex vivo. Infect Immun 83:942–949
- Martins FS, Rodrigues ACP, Tiago FCP, Penna FJ, Rosa CA, Arantes RME, Nardi RMD, Neves MJ, Nicoli JR (2007) *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. J Med Microbiol 56:352–359
- Martins FS, Vieira AT, Elian SDA, Arantes RME, Tiago FCP, Sousa LP, Araújo PPF, Bonjardim CA, Nicoli JR, Teixeira MM (2013) Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. Microbes Infect 15:270–279
- Medellin-Peña MJ, Griffiths MW (2009) Effect of molecules secreted by Lactobacillus acidophilus strain La-5 on Escherichia coli O157:H7 colonization. Appl Environ Microbiol 75:1165–1172
- Medellin-Peña MJ, Wang H, Johnson R, Anand S, Griffiths MW (2007) Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia* coli O157:H7. Appl Environ Microbiol 73:4259–4267
- Miszczycha SD, Thévenot J, Denis S, Callon C, Livrelli V, Alric M, Montel M-C, Blanquet-Diot S, Thevenot-Sergentet D (2014) Survival of *Escherichia coli* O26:H11 exceeds that of *Escherichia coli* O157:H7 as assessed by simulated human digestion of contaminated raw milk cheeses. Int J Food Microbiol 172:40–48
- Nakanishi N, Tashiro K, Kuhara S, Hayashi T, Sugimoto N, Tobe T (2009) Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Microbiology 155:521–530
- Naylor SW, Gally DL, Low JC (2005) Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. Int J Med Microbiol 295:419–441
- Nguyen HTT, Dalmasso G, Müller S, Carrière J, Seibold F, Darfeuille-Michaud A (2014) Crohn's disease—associated adherent invasive *Escherichia coli* modulate levels of microRNAs in intestinal epithelial cells to reduce autophagy. Gastroenterology 146:508–519
- Noguchi K, Gel YR, Brunner E, Konietschke F (2012) NparLD: an R software package for the nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. J Stat Softw 50:1–23
- Phillips A, Navabpour S, Hicks S, Dougan G, Wallis T, Frankel G (2000) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. Gut 47:377–381
- Putaala H, Salusjärvi T, Nordström M, Saarinen M, Ouwehand AC, Bech Hansen E, Rautonen N (2008) Effect of four probiotic strains and *Escherichia coli* O157:H7 on tight junction integrity and cyclo-oxygenase expression. Res Microbiol 159: 692–698
- R-Development-Core-Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
- Rund SA, Rohde H, Sonnenborn U, Oelschlaeger TA (2013) Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on EHEC strains of serotype O104:H4 and O157:H7. Int J Med Microbiol 303:1–8

- Scheiring J, Rosales A, Zimmerhackl LB (2010) Clinical practice: today's understanding of the haemolytic uraemic syndrome. Eur J Pediatr 169:7–13
- Serna A, Boedeker EC (2008) Pathogenesis and treatment of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* infections. Curr Opin Gastroenterol 24: 38–47
- Shigeno T, Akamatsu T, Fujimori K, Nakatsuji Y, Nagata A (2002) The clinical significance of colonoscopy in hemorrhagic colitis due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. Endoscopy 34:311–314
- Sun J, Zhou T-T, Le G-W, Shi Y-H (2010) Association of *Lactobacillus acidophilus* with mice Peyer's patches. Nutrition 26:1008–1013
- Swerdlow DL, Griffin PM (1997) Duration of faecal shedding of Escherichia coli O157:H7 among children in day-care centres. Lancet 349:745–746
- Tarr PI, Neill MA, Clausen CR, Watkins SL, Christie DL, Hickman RO (1990) *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology. J Infect Dis 162:553–556
- Thévenot J, Etienne-Mesmin L, Denis S, Chalancon S, Alric M, Livrelli V, Blanquet-Diot S (2013) Enterohemorrhagic *Escherichia coli*

O157:H7 survival in an in vitro model of the human large intestine and interactions with probiotic yeasts and resident microbiota. Appl Environ Microbiol 79:1058–1064

- Tiago FCP, Martins FS, Souza ELS, Pimenta PFP, Araújo HRC, Castro IM, Brandão RL, Nicoli JR (2012) Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. J Med Microbiol 61:1194–1207
- Tobe T, Nakanishi N, Sugimoto N (2011) Activation of motility by sensing short-chain fatty acids via two steps in a flagellar gene regulatory cascade in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun 79:1016–1024
- Toshima H, Yoshimura A, Arikawa K, Hidaka A, Ogasawara J, Hase A, Masaki H, Nishikawa Y (2007) Enhancement of Shiga toxin production in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7 by DNase colicins. Appl Environ Microbiol 73:7582–7588
- Turková K, Mavrič A, Narat M, Rittich B, Španová A, Rogelj I, Matijašić BB (2013) Evaluation of *Lactobacillus* strains for selected probiotic properties. Folia Microbiol 58:261–267
- Yu Y, Lee C, Kim J, Hwang S (2005) Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. Biotechnol Bioeng 89:670–679

COMMENTAIRES DE LA PUBLICATION N°2

L'objectif de cette étude était d'utiliser des approches *in vitro* et *in vivo* complémentaires afin de **mieux comprendre le comportement** de la souche de référence *E. coli* O157:H7 EDL 933 dans l'environnement colique humain (survie, virulence), son interaction avec le microbiote colique et l'épithélium intestinal et évaluer l'intérêt **d'une stratégie probiotique préventive** utilisant la levure *S. cerevisiae* CNCM I-3856 sur différents aspects de la physiopathologie bactérienne.

Ainsi, ont été déterminés dans l'environnement colique humain *in vitro* (i) la survie d'EDL 933 et l'expression des principaux gènes de virulence (*stx* et *eae*), (ii) l'effet du pathogène et du probiotique sur le microbiote colique implanté dans le fermenteur et (iii) l'influence de la levure sur la survie du pathogène et l'expression de ses facteurs de virulence. Dans un modèle *in vivo* d'anses iléales murines, nous avons ensuite étudié l'interaction du pathogène avec l'épithélium intestinal, et plus particulièrement les plaques de Peyer, et évalué la capacité du probiotique à inhiber ces interactions.

Évaluation de la survie et de la virulence d'*E. coli* O157:H7 dans l'environnement colique humain simulé

Comparativement aux travaux précédents de Thévenot et *al.* (2013), plusieurs adaptations méthodologiques ont été apportées dans cette publication. Tout d'abord, afin de se rapprocher au mieux des conditions *in vivo*, la souche EHEC a subi un stress de type gastrointestinal en « batch », préalablement à son introduction dans le système ARCOL. Puis, nous avons utilisé des selles issues de différents donneurs (trois dont une femme et deux hommes) afin de vérifier que les résultats obtenus n'étaient pas observés que chez un seul individu mais pouvait être généralisés. Enfin, nous avons augmenté l'inoculum bactérien (de 10⁵ à 10⁷ cellules/ml) afin de pouvoir suivre l'expression des gènes de virulence de la souche EHEC par RTq-PCR.

Nos résultats montrent que la souche EHEC O157:H7 EDL933 ne se maintient pas dans le bioréacteur, une élimination progressive du pathogène étant observée quel que soit

l'inoculum fécal introduit dans le fermenteur (3 donneurs différents). Ces données sont en adéquation avec celles de Gamage et al. (2006) en modèle murin où la présence d'un microbiote intestinal limite la colonisation d'E. coli O157:H7, et les données chez l'homme où le pathogène est rapidement éliminé des selles des patents. Ces données de survie confirment également les résultats obtenus précédemment au laboratoire avec un inoculum fécal issu d'un unique donneur (Thévenot et al. 2013). La même cinétique de survie du pathogène est observée chez les trois donneurs de matières fécales, suggérant que ce type de résultats pourrait être extrapolé à l'ensemble de la population. Néanmoins, il serait évidement nécessaire de confirmer ces résultats avec un plus grand nombre de donneurs de matières fécales ce qui permettrait de mettre en avant une flore ayant un caractère protecteur envers le pathogène. Par ailleurs, nous avons montré que l'application d'un stress gastro-intestinal et le changement de concentration de l'inoculum bactérien ne modifient pas la cinétique d'élimination du pathogène. Néanmoins, les concentrations testées (10⁵ et 10⁷ UFC/ml) sont supra-physiologiques et il serait intéressant d'évaluer la survie des EHEC dans l'environnement colique humain à des concentrations plus faibles, la dose infectieuse moyenne de ces bactéries étant proche de 10^2 UFC (Lin et *al.*, 1996). Enfin, il est à noter que ces données de survie ne peuvent bien sûr être généralisées à l'ensemble des souches EHEC, une seule souche de sérotype O157:H7 ayant été testée même si c'est celleci la plus virulente.

À ce jour, aucune donnée sur l'expression des facteurs de virulence des EHEC dans l'environnement digestif humain n'était disponible. Nous avons montré que les gènes *stx* et *eae* codant deux facteurs de virulence majeurs des EHEC, les Shiga-toxines et l'intimine, sont surexprimés dans l'environnement colique simulé. Ces résultats montrent que le contact avec l'épithélium intestinal n'est pas un pré-requis pour activer l'expression des gènes codant l'intimine, une adhésive majeure des EHEC, et que le microenvironnement colique est capable de moduler la virulence du pathogène. Cet effet pourrait être attribué à la présence d'AGCC, ces métabolites ayant déjà été décrits comme capable de réguler l'expression des gènes de virulence impliqués dans la mobilité, l'adhésion ou la formation des lésions A/E (Barnett Foster, 2013).

Influence de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 sur la survie et la virulence *d'E. coli* O157:H7 dans l'environnement colique humain simulé

D'après les travaux présentés dans la **publication n°1**, nos résultats indiquent pour S. cerevisiae CNCM I-3856 un taux de survie proche de 100% en fin d'intestin grêle. Nous avons donc introduit le probiotique dans le fermenteur, sans stress gastro-intestinal préalable, et à la concentration physiologique donnée de 10⁷ UFC/ml (Minelli et Benini, 2008). L'administration bi-quotidienne de S. cerevisiae CNCM I-3856 préalablement à l'ajout de la souche EHEC EDL933 et en post-exposition ne modifie pas la cinétique d'élimination du pathogène du milieu fermentaire. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par notre équipe lors d'études antérieures avec un traitement de type « curatif » (Thévenot et al., 2013). L'effet antagoniste de la souche de S. cerevisiae vis-à-vis de la reprise de croissance d'E. coli O157:H7 dans les parties distales de l'intestin grêle du TIM 1 (modèle estomac/intestin grêle) observé par Etienne-Mesmin, Livrelli et al. (2011) n'a donc pas été retrouvé en conditions coliques humaines simulées. Une des différences majeures entre ces deux modèles est l'absence de microbiote intestinal dans le tractus digestif supérieur in vitro. Aussi, il serait intéressant d'utiliser des modèles intégrant un microbiote intestinal dans les parties hautes du tractus digestif afin d'étudier l'influence d'un écosystème complexe sur le comportement des EHEC dans l'estomac et l'intestin grêle humains.

Nous avons également montré que l'administration de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 permet de diminuer significativement l'expression des gènes *stx*1 et *stx*2, sans modifier celle du gène *eae*. Il est probable que la régulation de l'expression des gènes de virulence des EHEC par les levures probiotiques soit consécutive à une modulation de l'activité fermentaire du microbiote colique (voir paragraphes suivants). La diminution de l'expression des gènes *stx* ou de la production de toxines par différentes souches probiotiques bactériennes a déjà été mise en évidence (Carey et *al.*, 2008 ; Reissbrodt et *al.*, 2009 ; Rund et *al.*, 2013 ; Takahashi et *al.*, 2004), mais jamais par une souche de levure, comme dans notre étude. C'est donc la première fois qu'une levure probiotique montre une action inhibitrice vis-à-vis de l'expression des gènes par une mesure directe de la production de toxines. Nous n'avons malheureusement pas pu réaliser ces mesures en raison de problèmes techniques (problèmes de stabilité de la toxine et de concentrations en Stx inférieures à la limite de détection).

Influence d'*E. coli* O157:H7 et de *S. cerevisiae* CNCM-I3856 sur les principales populations du microbiote colique

Les principales populations bactériennes appartenant aux phyla majoritaires du microbiote colique ont été suivies tout au long des fermentations dans ARCOL après administration du pathogène et/ou du probiotique. Aucun effet de l'administration des EHEC sur le microbiote colique n'a été observé, lorsque les résultats obtenus sur les trois donneurs ont été analysés ensemble. Thévenot et *al.* (2013) avaient observé une diminution des *Enterobacteriaceae* consécutive à l'administration d'EHEC, qui n'a pu être confirmée dans cette étude. Cependant, la concentration initiale en EHEC était supérieure à celle des *Enterobacteriaceae* commensales (7 log₁₀ versus 5 log₁₀ UFC/ml).

Comme dans la **publication n°1**, afin d'analyser les variations inter-individuelles du microbiote en réponse aux différents traitements, une classification hiérarchique ascendante a été effectuée. Alors que les échantillons «Témoin» des trois donneurs sont regroupés dans le même cluster, l'administration d'EHEC et/ou de probiotiques divise nos échantillons en groupes différents en fonction des donneurs, suggérant que la réponse du microbiote intestinal serait individu-dépendant. Nos résultats tendent donc à conforter l'idée que des facteurs associés à l'hôte, comme le microbiote intestinal, pourraient influencer l'évolution clinique des infections à EHEC (de Sablet et *al.*, 2009 ; Toshima, Hachio et *al.*, 2007) et l'efficacité des probiotiques. Néanmoins, il faudrait confirmer cette hypothèse en utilisant un nombre de donneurs plus important. L'utilisation de techniques de séquençage haut débit permettrait également d'obtenir une vision plus complète des modifications engendrées par les souches EHEC et probiotiques sur le microbiote colique.

Influence d'*E. coli* O157:H7 et de *S. cerevisiae* CNCM-I3856 sur l'activité métabolique du microbiote colique

Nous avons également évalué l'effet du pathogène et du probiotique sur l'activité métabolique du microbiote colique, en suivant la production d'AGCC majoritaires et minoritaires. En présence du pathogène, le traitement par les levures entraine une augmentation de la production d'acétate et une diminution de celle de butyrate, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment avec l'inoculum fécal d'une unique donneur par Thevenot *et al.* (2013).

Ces résultats suggèrent que, en présence du pathogène, les levures *S. cerevisiae* CNCM I-3856 peuvent moduler de façon bénéfique l'activité métabolique du microbiote colique. En effet, des travaux antérieurs ont montré que l'activité anti-infectieuse des bifidobactéries contre *E. coli* O157:H7 résulterait de la production d'acétate par ces bactéries, conduisant à une diminution du pH intestinal et à une inhibition de l'expression des gènes *stx* ou de la production de toxines ou encore à une inhibition de leur translocation (Asahara et *al.*, 2004 ; Fukuda et *al.*, 2011). Par ailleurs, le butyrate est connu pour augmenter l'expression de gènes du LEE et de gènes flagellaires impliqués dans la pathogénicité (Tobe et *al.*, 2011). L'effet inhibiteur des *S. cerevisiae* CNCM I-3856 sur l'expression des gènes *stx* pourrait donc s'expliquer par une modulation de l'activité du microbiote entraînant en une augmentation de la production d'acétate.

Influence de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 sur la translocation d'*E. coli* O157:H7 au travers de l'épithélium iléal murin

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 sur l'interaction d'*E. coli* O157:H7 EDL 933 avec l'épithélium iléal murin dans un modèle *in vivo* d'anses iléales. Nous avons montré pour la première fois que l'administration du probiotique limite l'interaction du pathogène avec les plaques de Peyer, mais pas avec l'épithélium de la muqueuse, diminuant de façon importante l'hémorragie des plaques de Peyer associée à l'infection à EHEC.

L'ensemble des mécanismes par lesquels les EHEC ciblent préférentiellement les plaques de Peyer ne sont pas clairement identifiés à l'heure actuelle, ce qui rend difficile la compréhension du mécanisme d'action des levures.

Des données de la littérature indiquent que des probiotiques du genre *Saccharomyces* peuvent piéger à leur surface certaines bactéries entéropathogènes, comme *Salmonella Typhimurium*, et ainsi diminuer leur interaction avec l'épithélium intestinal (Martins et *al.*, 2007 ; Tiago et *al.*, 2013). De plus, l'adhésion des EHEC à la surface de *S. boulardii* a déjà été observée par Gedek (1999). Nous avons donc voulu déterminer s'il existait une interaction directe entre notre souche O157:H7 EDL933 et la levure *S. cerevisiae* CNCM I-3856 à l'aide

de test d'agglutination. Nos résultats ont montré que le pathogène n'agglutine pas avec la levure, invalidant cette première hypothèse.

L'adhésion à la paroi des levures est directement liée au pili de type I. Nous nous sommes donc intéressées à sa présence potentielle chez la souche de référence EHEC O157:H7 EDL933. Les souches de sérotype O157:H7 sont connues pour ne presque jamais exprimer le pili de type 1 bien qu'elles possèdent l'opéron *fim* codant ce pili (Durno et *al.*, 1989). FimH est une adhésine qui reconnait le mannose. Shaikh et collaborateurs (2007) ont décrit chez certaines souches EHEC une délétion de 16 pb en amont du gène *fimA* ainsi qu'une mutation dans le gène *fimH* conduisant au remplacement de l'acide aminé 135 asparagine par une lysine. En utilisant la même stratégie PCR que celle décrite dans cette étude (et présentée dans la **publication n°3**), nous avons montré la présence de cette mutation et donc l'absence de pili de type I à la surface de la souche O157:H7 EDL933 qui ne peut donc interagir directement avec la levure de cette façon.

Compte tenu de ces éléments, notre hypothèse à ce jour est que l'inhibition par le probiotique pourrait être due à une compétition avec le pathogène pour un récepteur à la surface des plaques de Peyer ou à un encombrement stérique des probiotiques qui empêcherait l'accès des pathogènes aux plaques de Peyer. Dans le but d'étudier plus spécifiquement l'interaction d'E. coli O157:H7 EDL933 et de la levure probiotique avec les plaques de Peyer, un test in vitro en plaque 96 puits a été réalisé : des plaques de Peyer prélevées chez des souris ont été mises en contact pendant 1 h en présence soit du pathogène seul, soit de la levure seule, soit du pathogène et de la levure. Nous avons observé que la présence du probiotique entraine une inhibition de 53 % des interactions entre la souche O157:H7 et les plaques de Peyer et cette inhibition n'est pas observée au niveau de la muqueuse. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment dans le modèle d'anses iléales in vivo. Sun et al. (2010) ont montré que Lactobacillus acidophilus était capable d'adhérer aux plaques de Peyer et que cette adhésion était inhibée par la présence de carbohydrates tels que le mannose. Les auteurs concluent que des lectines à la surface de L. acidophilus seraient capables de reconnaître spécifiquement des résidus mannose à la surface des plaques de Peyer. L'identification de ces carbohydrates et l'étude de leur influence dans l'interaction avec les EHEC et la levure probiotique sont des pistes intéressantes à explorer dans le but de poursuivre l'étude des mécanismes associés à l'effet antagoniste de S. cerevisiae CNCM I-3856.

CHAPITRE 3 :

INTERACTION DES EHEC AVEC L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL

Introduction à la publication n°3

Le pouvoir pathogène des EHEC est essentiellement lié à la production des Shigatoxines, mais le processus infectieux est multifactoriel et d'autres facteurs semblent jouer un rôle dans la virulence. En effet, de nombreuses souches productrices de Shiga-toxines ne sont pas pathogènes chez l'homme, probablement parce qu'elles ne sont pas capables de survivre dans l'estomac ou de coloniser le tube digestif humain. *A contrario*, les souches pathogènes seraient capables de coloniser le tube digestif, et présenteraient un tropisme particulier pour l'épithélium associé au follicule ou FAE (« follicle associated epithelium ») des plaques de Peyer localisé au niveau de l'iléon terminal (Chong et *al.*, 2007 ; Phillips et *al.*, 2000 ; Fitzhenry et *al.*, 2006). Le FAE est caractérisé par la présence de cellules spécialisées, les cellules M, qui jouent un rôle clef dans l'échantillonnage des antigènes et de pathogènes vers les plaques de Peyer et les macrophages sous-jacents.

Des travaux réalisés précédemment au laboratoire ont permis de proposer un nouveau modèle dans la physiopathologie de des infections à EHEC. Le ciblage des plaques de Peyer constituerait une des premières étapes du processus infectieux. Les bactéries seraient ensuite phagocytées par les macrophages, au sein desquels elles sont capables de se répliquer et de produire des Stx. Ces toxines entrainent l'apoptose de la cellule hôte, ce qui conduirait à la libération des bactéries et des toxines dans la *lamina propria* et à la dissémination des toxines



FIGURE 46. Modèle *in vitro* **de culture de cellules M** (D'après Gullberg et *al.*, 2000)

Les facteurs de différenciation sécrétés par les cellules Raji B induisent le phénotype cellules M qui se caractérise par des modifications morphologiques (microvillosités désorganisées) et l'expression de marqueurs spécifiques des cellules M. Les bactéries sont déposées dans le transwell et le milieu basal est récupéré post-infection en fonction du temps puis étalé pour dénombrer les bactéries ayant transloqué.



FIGURE 47. Modèle in vivo d'anses iléales (D'après Beuzón et Holden, 2001)

L'interaction *in vivo* des EHEC avec la muqueuse intestinale (avec ou sans plaques de Peyer) est étudiée en réalisant des anses iléales en modèle murin. Après anesthésie, une incision abdominale permet d'extraire l'iléon. Un segment d'iléon contenant des plaques de Peyer est ligaturé et un mélange composé de 50 % de la souche sauvage et 50 % d'un mutant ou d'une souche transcomplémentée (5.10⁸ CFU/mL) est injecté. Arprès 5h d'infection, les animaux sont sacrifiés et le nombre de bactérie interagissant la muqueuse est calculé par l'indice de compétition.

CFU : Colonie formant unité ; *lpf* : gène codant les « Long Polar Fimbriae » ; **WT :** « wild-type » souche sauvage

dans la circulation sanguine jusqu'aux organes cibles (cerveau, reins et côlon). Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans le ciblage des plaques de Peyer restent mal connus.

Les « Long polar fimbrae » (Lpf) sont des adhésines putatives d'abord décrites chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Bäumler et *al.*, 1996) et largement répandues dans toutes les classes d'*E. coli* pathogènes, en particulier chez les AIEC (Adherent Invasive *E. coli*) et les EPEC (*E. coli* entéropathogènes), mais aussi chez certains *E. coli* commensaux non pathogènes (Hu et *al.*, 2015 ; Chassaing et *al.*, 2011 ; Doughty et *al.*, 2002 ; Toma et *al.*, 2006). Chez *Salmonella* et les AIEC les Lpf jouent un rôle dans les interactions avec les plaques de Peyer, donc dans la virulence (Bäumler et *al.*, 1996 ; Chassaing et *al.*, 2011). Chez les EHEC, quatre opérons *lpf* ont été mis en évidence (Doughty et *al.*, 2002 ; Perna et *al.* 2001), mais leur rôle dans la pathogénicité n'est pas clairement défini. Des études ont montré que les Lpf pourraient être impliqués dans l'adhésion et la colonisation intestinale, plus précisément en interagissant avec les protéines de la matrice extra cellulaire, mais les données obtenues sont contradictoires (Jordan et *al.*, 2004 ; Farfan et *al.*, 2011 ; Lloyd et *al.*, 2012).

Dans ce contexte, par analogie avec *Salmonella* et les AIEC, nous avons voulu évaluer le rôle des Lpf dans le ciblage de la souche O157:H7 EDL933 aux plaques de Peyer. Des mutants délétés des gènes *lpf* ont été construits, leur capacité de translocation au travers de la muqueuse intestinale a été évaluée à l'aide d'approches complémentaires : *in vitro* (modèle original de culture des cellules M (**FIGURE 46**) et *in vivo* (anses iléales de souris contenant des plaques de Peyer (**FIGURE 47**). Ces travaux ont également permis de déterminer la prévalence de trois opérons *lfp* au sein d'une collection de souches STEC, d'évaluer l'expression des gènes *lpf* chez la souche O157:H7 EDL933 durant son transit dans le tractus digestif humain en utilisant **le système digestif artificiel TIM-1** (Minekus et *al.*, 1995) simulant de la façon la plus physiologique possible les conditions rencontrées dans la lumière gastro-intestinale du tractus digestif supérieur de l'Homme et le **système ARCOL**, reproduisant l'environnement colique humain.

PUBLICATION N°3

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis: Role of Long polar fimbriae in Peyer's patches interactions

2017 – Scientific Reports – (Impact factor₂₀₁₆: 5.228)

<u>Charlotte CORDONNIER</u>, Lucie ETIENNE-MESMIN, Jonathan THÉVENOT, Amandine ROUGERON, Sandra RENIER, Benoît CHASSAING, Arlette DARFEUILLE-MICHAUD, Nicolas BARNICH, Stéphanie BLANQUET-DIOT et Valérie Livrelli

SCIENTIFIC **Reports**

Received: 26 October 2016 Accepted: 13 February 2017 Published: xx xx xxxx

OPEN Enterohemorrhagic Escherichia coli pathogenesis: role of Long polar fimbriae in Peyer's patches interactions

Charlotte Cordonnier^{1,2}, Lucie Etienne-Mesmin^{1,2,†}, Jonathan Thévenot^{1,2,‡}, Amandine Rougeron¹, Sandra Rénier¹, Benoit Chassaing^{1,†}, Arlette Darfeuille-Michaud^{1,*}, Nicolas Barnich¹, Stéphanie Blanquet-Diot² & Valérie Livrelli^{1,3}

Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) are major food-borne pathogens whose survival and virulence in the human digestive tract remain unclear owing to paucity of relevant model. EHEC interact with the follicle-associated epithelium of Peyer's patches of the distal ileum and translocate across the intestinal epithelium via M cells, but the underlying molecular mechanisms are still unknown. Here, we investigated the involvement of Long polar fimbriae (Lpf) in EHEC pathogenesis. Of the 236 strains tested, a significant association was observed between the presence of lpf operons and pathogenicity. In sophisticated in vitro models of the human gastro-intestinal tract, lpf expression was induced during transit through the simulated stomach and small intestine, but not in the colonic compartment. To investigate the involvement of Lpf in EHEC pathogenesis, lpf isogenic mutants and their relative transcomplemented strains were generated. Translocation across M cells, interactions with murine ileal biopsies containing Peyer's patches and the number of hemorrhagic lesions were significantly reduced with the lpf mutants compared to the wild-type strain. Complementation of lpf mutants fully restored the wild-type phenotypes. Our results indicate that (i) EHEC might colonize the terminal ileum at the early stages of infection, (ii) Lpf are an important player in the interactions with Peyer's patches and M-cells, and could contribute to intestinal colonization.

Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC), as a subgroup of Shiga toxin (Stx)-producing E. coli (STEC), are food borne pathogens responsible for human diseases. In addition to uncomplicated diarrhea, EHEC can cause hemorrhagic colitis (HC) and life-threatening complications such as the hemolytic-uremic syndrome (HUS)¹. Ruminants, especially cattle, are a natural reservoir of STEC, and human infection is linked with the consumption of contaminated food. STEC belong to a wide range of serotypes; however, only a limited number has been associated with human disease, among which EHEC O157:H7 is the most prevalent serotype associated with outbreaks and sporadic cases worldwide². Based on the association of serotypes with diseases of varying severity in humans and with outbreaks or sporadic disease, STEC have been classified into 5 seropathotypes: A (associated with outbreaks and HUS and belonging to the O157:H7 serotype), B (associated with outbreaks and HUS but less commonly than serotype O157:H7), C (associated with sporadic HUS but not with outbreaks), D (associated with diarrhea but not with outbreaks or HUS cases), and E (serotypes that have not been involved in disease in humans)³. To date, the management of EHEC infections only includes supportive therapy, since antibiotics could worsen clinical outcomes4.

Survival and colonization of the human gastrointestinal (GI) tract are key features of EHEC infections but remain poorly described due to the lack of relevant models. EHEC viability and expression of virulence genes in

¹Université Clermont Auvergne, Inserm U1071, M2iSH "Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte", USC-INRA 2018, F-63000 Clermont-Ferrand, France. ²Université Clermont Auvergne, MEDIS "Microbiologie Environnement DIgestif Santé", F-63000 Clermont-Ferrand, France. ³CHU Clermont-Ferrand, Service de Bactériologie, Parasitologie Mycologie, Clermont-Ferrand, 63000, France. [†]Present address: Institute for Biomedical Sciences, Georgia State University, Atlanta, GA, 30303, USA. *Present address: STLO, "Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf " Agrocampus Ouest, INRA, Rennes, 35042, France. *In memoriam. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.L. (email: valerie.livrelli@udamail.fr)





the digestive environment have been mostly investigated in oversimplified *in vitro* models not representative of human physiological conditions^{5–7}. In the human digestive tract, EHEC strains produce Shiga-toxins (Stx) considered to be essential for virulence and major risk factors for severe EHEC infections. Meanwhile, EHEC pathogenesis is not restricted to toxin-mediated effects, and a combination of virulence traits seems to be required, as demonstrated by the intimate bacterial attachment to host epithelial cells leading to the characteristic attaching and effacing (A/E) lesions^{8,9}.

The terminal ileum and colon are considered to be the main sites of EHEC colonization in humans¹⁰. *In vitro* organ culture (IVOC) studies have demonstrated a preferential tropism of EHEC O157:H7 for the Follicle-Associated Epithelium (FAE) of Peyer's patches, mainly localized in the distal ileum in humans¹¹. It has been hypothesized that the Peyer's patches-rich distal ileum might represent the initial site of EHEC adhesion and colonization, and EHEC would then spread to other regions of the gut¹². Concurrently, the FAE promotes uptake of antigens and microorganisms through specialized epithelial cells with high transcytotic capacity, termed M-cells^{13,14}. A previous study has suggested an interaction of EHEC strains with murine Peyer's patches, followed by a translocation through M cells from the gut lumen to underlying tissues. After bacterial uptake by M cells, Stx induces apoptosis in underlying infected macrophages, which yields to toxin release in the *lamina propria*. Stx would then enter the bloodstream to reach target organs, leading to severe disease in humans¹⁵. However, underlying molecular mechanisms involved in M cell targeting remain poorly investigated, and the bacterial effectors associated have not yet been defined.

Long polar fimbriae (Lpf), first described as putative adhesins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, have been shown to attach directly to murine Peyer's patches^{16,17}. Lpf have also been previously described in Crohn's disease-associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* (AIEC) as key players in their interactions with M cells¹⁸. Genome analysis of EHEC O157:H7 strain EDL933 revealed the presence of two *lpf* clusters encoded by O-islands 141 and 154, closely related to Lpf of *Salmonella* Typhymurium^{19–21}. In EHEC O157:H7, Lpf have been reported to be involved in the adhesion process and micro-colony formation at the surface of cultured cells^{21,22} probably through binding to extracellular matrix protein²³. Recent studies supported the role of Lpf in the induction of host pro-inflammatory responses to EHEC infection^{24,25}. In EHEC O157:H7 strain EDL933²⁶. Lpf_{OI-113}, identified located at the same position of the O island 154 in EHEC O157:H7 strain EDL933²⁶. Lpf_{OI-113}, identified in *E. coli* strains of other serogroups, may be involved in adherence of *E. coli* strains to epithelial cells²⁷.

In the present study, the roles of Lpf in EHEC pathogenicity and of tropism to Peyer's patches were investigated using *in vitro* and *in vivo* approaches. First, the prevalence of *lpf* operons was analyzed according to STEC seropathotype and origin, in a collection of 236 strains of known serotype. A strong association of the lpf_{OI-141} and lpf_{OI-154} operons and pathogenicity was observed. Then, *lpf* expression was investigated in relevant dynamic *in vitro* models of the human digestive tract, with *lpf* being overexpressed in gastric and small intestinal conditions but not in colonic ones. Using *lpf* isogenic mutants and their relative trans-complemented strains, we showed that expression of *lpf* genes is required for an active translocation across M cell monolayer *in vitro* and for interactions with Peyer's patches in mice ileal loops *in vivo*.

Results

*lpfA*_{0I-141} and *lpfA*_{0I-154}, but not *lpfA*_{0I-113}, are associated with pathogenic strains. Some STEC serotypes recovered from animals or food have never been associated with human diseases, therefore STEC strains were classified into seropathotypes, according to association with HUS and outbreaks²⁸. To assess the potential links between *lpf* operons and STEC pathogenicity, the prevalence of *lpfA*_{0I-141}, *lpfA*_{0I-154} and *lpfA*_{0I-113} was investigated in a collection of 236 STEC strains isolated from humans, animals or food and classified according to the source and seropathotype (Fig. 1). Among the 236 strains of known serotype^{29,30}, 175 were isolated from bovine feces, 27 from HUS and HC patients, 24 from food samples and 10 from asymptomatic children. The *lpf*_{0I-141} and *lpf*_{0I-154} operons were identified in 15 (6.4%) and 30 (12.7%) of the 236 STEC strains, respectively, *versus* 143 (60.6%) for *lpfA*_{0I-113} (Supplemental Fig. 1A and B). However, *lpf*_{0I-141} and *lpf*_{0I-154} were significantly (p < 0.01) more prevalent in strains isolated from HUS and HC patients than from other sources (Fig. 1A), while *lpfA*_{0I-113} was mainly found in strains isolated from bovine feces (112 versus 8 in HUS and HC patients,

p < 0.001). When the strains were categorized according to seropathotype (Fig. 1B), the prevalence of lpf_{OI-141} and lpf_{OI-154} was significantly higher (p < 0.001) and reached 100% in the seropathotype A (which includes the most virulent strains linked with severe disease and outbreaks), compared to other seropathotypes. By contrast, the prevalence of lpf_{OI-113} was significantly higher (p < 0.001) in seropathotype C to E (no link with disease) than in seropathotypes A and B. All the strains belonging to seropathotype A harbored both lpf_{OI-141} and lpf_{OI-154} operons, but not the lpf_{OI-113} genes (Fig. 1B). Overall, a strong association was observed between STEC strains harboring both lpf_{OI-141} and lpf_{OI-154} , and belonging to seropathotype A, including O157:H7 strains known to be involved in the majority of human cases.

lpf operon expression is induced *in vitro* in the stomach and small intestine but not in the large intestinal compartment. Survival kinetics of *E. coli* O157:H7 strain EDL933 were investigated in TIM (TNO GastroIntestinal Model) and ARCOL (Artificial COLon) models (Fig. 2A-C). The TIM model simulates the stomach, and the three segments of the small intestine and the ARCOL system mimics the large intestine environment. In these in vitro models, results were expressed as percentages of initial intake and cross-compared to those obtained with a theoretical transit marker giving a 100% survival rate for bacteria. Bacterial counts below that of the transit marker will reflect cell mortality, while counts above the transit marker will be an indicator of bacterial growth. During gastric transit, no significant difference was observed between the curve obtained for bacteria and that of the transit marker, indicating that the viability of EDL933 was not modified by gastric conditions (Fig. 2A). Meanwhile, in the ileal compartment (Fig. 2B), a significant (p < 0.001) bacterial mortality was observed between 120 and 180 min. At 180 min, bacterial recovery percentages were $4.3 \pm 2.4\%$ (n = 3) compared to 25.2% for the transit marker. The trend reversed at the end of digestion in the ileal compartment (300 min) when the curve for bacteria exceeded that of the transit marker, indicating a bacterial growth with a survival percentage of $21.1 \pm 17.4\%$ (n = 4) for EDL933 compared to 4.0% for the transit marker. In ARCOL (Fig. 2C), even if a bacterial growth was observed 1 h post-administration ($126.1 \pm 29.4\%$ for bacteria versus 97.1% for the marker, p < 0.001), from 6 h to the end of the experiment, we observed that EDL933 was eliminated from the colonic medium at a rate more rapid than that of the theoretical transit marker. These results indicate an absence of colonization in the bioreactor.

The $lpfA_{OI-141}$ and $lpfA_{OI-154}$ expression levels were then measured in the *in vitro* models (Fig. 2D–F). In the gastric effluents from the TIM system, $lpfA_{OI-141}$ and $lpfA_{OI-154}$ were over-expressed whatever the sampling time (Fig. 2D): the highest expression levels were observed at 0–10 min, with fold increases of $13.3 \pm 4.7\%$ and $19.7 \pm 4.7\%$ (n = 3, p < 0.001) for $lpfA_{OI-141}$ and $lpfA_{OI-154}$ respectively, compared to the initial time point. In the ileal effluents, a similar trend was observed from 60 to 300 min, with up to 6.4 and 16.4 fold induction of $lpfA_{OI-141}$ and $lpfA_{OI-154}$ respectively (p < 0.05) (Fig. 2E). In contrast, lpf expression was not significantly induced in the colonic medium whatever the sampling time assayed (Fig. 2F).

To better understand the parameters of human digestion controlling *lpf* genes expression, we further assessed the effect of bile salts on *lpf*A_{0I-141} and *lpf*A_{0I-154} mRNA levels when *E. coli* O157:H7 strain EDL933 was grown until exponential or stationary phases in Luria Bertani (LB) or cell culture medium (DMEM) (Fig. 2G). In the exponential phase, *lpf*A_{0I-154} expression levels were significantly higher (p < 0.01) in DMEM compared to LB medium. Also, bile salts induced an increase in *lpf*A_{0I-141} and *lpf*A_{0I-154} expression when bacteria were either in exponential or stationary growth phases. The highest expression levels were observed with *lpf*A_{0I-154} when grown to exponential phase, in both LB and DMEM media, with up to 9 fold increase (p < 0.05).

Type I pili are not expressed in EHEC O157:H7 EDL933. *E. coli* bacteria were previously reported to interact with Peyer's patches via type I pili³¹. Since Shaikh *et al.*³² showed that a deletion in the *fim* operon results in the absence of type I pili expression in most O157:H7 strains, we next investigated the type I pili genotype in EHEC O157:H7 strain EDL933 using the PCR strategy previously described (Supplemental Methods; Fig. 3A). Primers C and B produced a 936 pb amplicon with O157:H7 strain EDL933, whereas no amplification was observed with primers A and B, indicating a deletion in the *fim* operon in this strain (Fig. 3B). By contrast, this deletion is absent in the control AIEC strain LF82. Western blot analysis using polyclonal anti- α F1 antibody (Fig. 3C) and electron microscopic visualization of negatively stained bacteria (Fig. 3D) confirmed the absence of type I pili expression can be appreciated by yeast agglutination (Supplemental Methods), we also investigated the capacity to agglutinate of EDL933 and LF82 with yeast. While visible agglutinates were observed with the positive control (LF82 strain) until 1/10 dilution, EDL933 did not agglutinate (Fig. 3E).

Deletion of *lpf* **genes does not alter bacterial growth, mobility nor cytotoxicity.** To investigate the involvement of Lpf in the ability of EHEC O157:H7 strain EDL933 to target Peyer's patches, $\Delta lpfA_{OI-141}$, $\Delta lpfA_{OI-154}$, $\Delta lpfA_{OI-154}$, $\Delta lpfA_{OI-154}$ isogenic mutants and mutants trans-complemented with their respective *lpf* genes were generated. We also used an O6:H10 strain (NV110) naturally deficient in *lpf* genes as previously reported by Pradel *et al.*³³. O6:H10 strains are widely found in cattle but have never been involved in human infections^{33,34}. The growth rate and the motility of wild-type strain EDL933, the *lpf* isogenic mutants and the trans-complemented strains do not markedly differ (Supplemental Fig. 2A,B), indicating that *lpf* genes are not essential for bacterial growth and motility. Electron microscopic observation confirmed that deletion of *lpf* genes does not alter their motility, or flagella expression (Supplemental Fig. 2C). Also, *lpf* deletion does not alter Stx production (Supplemental Fig. 2D) since Stx titers were similar for the wild-type EDL933 strain (cytotoxic titer 1/256 equivalent to 8.2 ± 1.8 ng/ml).

Deletion of *lpf* **genes does not modify EHEC adhesion to Caco-2 immortalized epithelial cells.** Since Lpf were previously described to interact with intestinal epithelial cells, adhesion capacity of



Figure 2. lpf genes are expressed in the human simulated gastric and small intestine environment but not in the colon. EHEC O157:H7 strain EDL933 survival and *lpf* gene expression were assessed in the artificial stomach (A and D), ileum (B and E) and colon (C and F), after administration of 107 UFC/mL of EHEC O157:H7 strain EDL933. (A,B and C) The bacterial population was estimated by regular plating on LB medium or by qPCR on stx1 gene, in the TNO GastroIntestinal model (TIM) model (stomach, ileum) and Artificial COLon (ARCOL) model (large intestine), respectively. The profiles obtained for EDL933 were compared to that of theoretical transit markers (black line). Results are expressed as percentages of initial intake \pm standard deviations (n = 3). Results obtained for EDL933 significantly different from that of the transit marker at p < 0.05 (*), p < 0.01(**) and p < 0.001 (***). (D,E and F) Total RNAs were extracted from the gastric and ileal effluents of the TIM model and from the colonic medium in ARCOL and lpfA_{OI-141} and lpfA_{OI-154} expression was analyzed by RTq-PCR. The black dotted line indicates pH in the different digestive compartments. The 16S rRNA gene was used as an internal standard to normalize the data. Results are expressed as means of fold-induction (calculated using the Ct method with t0 as reference) \pm standard deviations (n = 3). Time points statistically different from t0 at p < 0.05 (*), p < 0.01 (**) and p < 0.001 (***). (G) Influence of growth phase and bile salts (2%) on the expression of $lpfA_{OI-141}$ and $lpfA_{OI-154}$ was investigated in LB and DMEM media. Total RNAs were extracted after 3 h (exponential phase) or overnight (stationary phase) from a culture of EHEC O157:H7 strain EDL933 and lpfA_{OI-141} and lpfA_{OI-154} expression was analyzed by RTq-PCR. Results are expressed as means of fold-induction (calculated using the Ct method with t0 as reference) \pm standard deviations (n = 3). Statistically different from results obtained in LB medium without bile salts during the exponential phase at p < 0.05 (*) or p < 0.01 (**).



Figure 3. Absence of type I pili expression in EHEC O157:H7 strain EDL933. (A) Schematic representation of the PCR strategy described by Shaikh et *al.*³² to show the deletion (Δ 16 bp) in the Fim region in *E. coli* O157:H7 strains. Primers A (bolded nucleotides) and B (underlined nucleotides) produce an amplicon in an intact configuration. Primers C (italicized nucleotides in box) and B produce an amplicon in a deleted configuration. (B) Ethidium bromide staining showing detection in the Fim region of EHEC O157:H7 strain EDL933 and AIEC strain LF82 (positive control). (C) Western blot analysis of type I pili in EHEC O157:H7 strain EDL933 and AIEC strain LF82 using the anti- α F1 antibody. The predicted size of FimA is 18.2 kDa (indicated by arrow). (D) Transmission electron micrographs of negatively stained EHEC O157:H7 strain EDL933 and AIEC strain LF82 strains taken at ×15,000 magnification (scale bar = 5µm). Type I pili and flagella are indicated by arrows. (E) Results of yeast agglutination assays with EHEC O157:H7 strain EDL933 and AIEC strain LF82 of yeast agglutination assays with EHEC O157:H7 strain EDL933 and AIEC strain LF82 of yeast agglutination assays with EHEC O157:H7 strain EDL933 and AIEC strain LF82 of yeast agglutination assays with EHEC O157:H7 strain EDL933 and AIEC strain LF82 of yeast agglutination assays with EHEC O157:H7 strain EDL933 and AIEC strain LF82. Dilution rates of bacterial suspension are indicated on the corresponding wells. Negative control without bacteria (-).

EDL933 wild-type strain, isogenic mutants and trans-complemented strains was investigated using the Caco-2 human colonic carcinoma cell line (Supplemental Fig. 2E). Bacterial strains were cultivated in conditions enhancing *lpf* expression (i.e. exponential phase, in the presence of bile salts). In the conditions tested, all EHEC strains adhered to Caco-2 cells at a very low level compared to AIEC strain LF82 (<5% versus 22.2 \pm 7.3%) (p<0.001). No significant difference was observed between the wild-type EDL933 strain (0.6 \pm 0.2%), the $\Delta lpfA_{OI-141}/\Delta lpfA_{OI-154}$ isogenic mutant (0.9 \pm 0.7%) or the trans-complemented strain (1.3 \pm 1.6%), indicating that Lpf are not involved in EHEC adhesion to Caco-2 epithelial cells *in vitro*.

Lpf are required for an active translocation of EHEC across human M cells monolayer *in vitro*. Using polarized enterocyte-like Caco-2 cl1 cells that acquire M cell-like characteristics when co-cultured with the Raji B cell line, the interactions of EHEC with M cells were investigated and compared to Caco-2 cl1 monocultures. Whereas high levels of translocation were observed across M cell monolayers for EDL933, only a few bacteria translocated across Caco-2 cl1 monolayers after 6 h of infection (Fig. 4A and B). The translocation of EHEC bacteria across Caco-2 cl1 or M cells was not the result of a loss of the monolayer integrity since TEER stayed constant during the 6 h of infection (data not shown). At 4 and 6 h postinfection, a significant (p < 0.001)



Figure 4. Lpf are needed for active translocation of EHEC strain EDL933 across M cell monolavers and in vivo interactions with murine Peyer's patches. Caco-2 cl1 and M cells were infected with 107 EHEC bacteria (wild-type EHEC O157:H7 strain EDL933, lpf isogenic mutants, trans-complemented strains and O6:H10 strain NV110) per TranswellTM. The number of translocated bacteria across Caco-2 cl1 (A) and M cells (B) was determined at 2, 4 and 6 h post-infection by plating on selective agar plates. Results are expressed as mean $CFU/ml \pm$ standard deviation (n = 3). Translocation through Caco-2 cl1 or M cells significantly different between wild-type strain EDL933 and isogenic mutants or O6:H10 NV110 at p < 0.001 (α). Translocation through Caco-2 cl1 or M cells significantly different between isogenic mutants and trans-complemented strains at p < 0.001 (β). (C and D) Mice ileal loops (n = 10) were inoculated with a mixed inoculum containing equivalent number (5·108 CFU/ml) of EHEC O157:H7 strain EDL933 wild-type strain and either lpf isogenic mutants, trans-complemented mutants or the O6:H10 strain NV110. Bacterial interactions with ileal mucosa (C) or Peyer's patches (D) were determined by competitive index (CI) analysis relative to the O157:H7 wild-type strain. Significant differences between CI obtained with isogenic mutants and the trans-complemented strains at p < 0.05 (*), p < 0.001 (**) or p < 0.001 (***). CI of O6:H10 significantly different from 1 at p < 0.001 (**). (E) Macroscopic view of hemorrhagic (*left*) or non-hemorrhagic (*right*) Peyer's patches. (F) The percentages of hemorrhagic Peyer's patches were determined in mice ileal loops infected with wild-type EHEC strain EDL933 (N = 32) or $\Delta lpfA_{OI-141}/\Delta lpfA_{OI-154}$ isogenic mutant (N = 26). Percentages obtained with $\Delta lpfA_{OI-141}/\Delta lpfA_{OI-154}$ mutant significantly different from that of wild-type strain at p < 0.001 (***).

.....

decrease in the amount of translocated bacteria across M-like cells was observed for $\Delta lpfA_{OI-141}$, $\Delta lpfA_{OI-154}$, and $\Delta lpfA_{OI-141}/\Delta lpfA_{OI-154}$ mutants compared to the wild-type strain (Fig. 4B). Trans-complementation of $lpfA_{OI-141}$ and/or $lpfA_{OI-154}$ genes restored the ability of mutant strains to translocate specifically across M cells (Fig. 4B). Interestingly, after a 6 h infection EHEC O6:H10, which is naturally deficient in *lpf* genes, also translocated at levels drastically lower (p < 0.001) compared to those of the wild-type O157:H7 strain. Altogether, these results indicate that Lpf play a key role in targeting M cells.

Lpf are needed for EHEC interactions with murine Peyer's patches in vivo. The interaction between lpf isogenic mutants and murine Peyer's patches was analyzed in vivo in a competitive assay in ileal loop where a mixed inoculum comprising equivalent numbers of two bacterial strains (wild-type strains and either lpf isogenic mutants, trans-complemented strains or a strain naturally deficient in lpf genes) is inoculated into ligated ileal loop. At 5 h post infection, the numbers of mucosa-interacting bacteria were counted to define competitive indices (CI) relative to the O157:H7 wild-type strain. CI close to 1 indicated a similar level of interactions with intestinal tissue (ileal mucosa or Peyer's patches) between the two strains tested. In ileal mucosa, CIs close to 1 were observed when wild-type EDL933 was co-inoculated with $\Delta lpfA_{OI-141}$ (0.8 ± 0.8), $\Delta lpfA_{OI-154}$ (0.9 ± 0.7) or $\Delta lpfA_{OI-141}/\Delta lpfA_{OI-154}$ (0.8 ± 0.1) isogenic mutants (Fig. 4C) indicating that lpf genes have no influence on the interactions of EHEC EDL933 with ileal mucosa. By contrast, significant decreases in CI were observed in Peyer's patches when $\Delta lpfA_{OI-141}$ (0.4 \pm 0.2), $\Delta lpfA_{OI-154}$ (0.6 \pm 0.2) and $\Delta lpfA_{OI-141}$ / $\Delta lpfA_{OI-154}$ (0.7 \pm 0.4) isogenic mutants were co-inoculated with wild-type strain (Fig. 4D), indicating that deletion of lpf genes significantly reduced the ability of O157:H7 EDL933 to interact with Peyer's patches. Trans-complementation of *lpf* mutants restored their ability to interact with Peyer's patches, at a level similar to that of the wild-type strain for $\Delta lpfA_{OI-154}$ (0.9 ± 0.3) or even higher for $\Delta lpfA_{OI-141}$ (1.5 ± 0.5) and $\Delta lpfA_{OI-141}/\Delta lpfA_{OI-154}$ (2.6 ± 1.3) . These results were confirmed with an O6:H10 strain (lacking lpf genes) which showed a CI of 0.4 ± 0.1 , close to that of lpf mutants. Our data indicate that Lpf are required for EHEC interactions with Peyer's patches. Bloodshot Peyer's patches were macroscopically observed following infection with wild-type EDL933 strain or $\Delta lpfA_{OI-141}/\Delta lpfA_{OI-154}$ mutants (Fig. 4E). A significant (p < 0.001) decrease in the number of hemorrhagic Peyer's patches was observed with the double mutant compared to the wild-type strain (31 versus 66%; Fig. 4F).

Discussion

Food-borne infections caused by EHEC bacteria have emerged as an important public health concern worldwide. EHEC survival and virulence in the human digestive tract, as well as interactions with the intestinal epithelium, are key features in bacterial pathogenesis but remain largely unknown. It is well documented that several pathogene microorganisms use M-cells and Peyer's patches to invade the host intestinal mucosa³¹.

Up to date, few studies have investigated the behavior of EHEC strains in human simulated GI conditions. Studies available have been carried out in oversimplified in vitro systems⁵⁻⁷ integrating only a limited number of digestive parameters (such as gastric acidic pH or bile salts), far from in vivo complexity. Using the dynamic TIM model that reproduces human GI digestive process, we demonstrated that EDL933 survival was not affected by human-simulated gastric conditions when administered with water. EHEC are considered as acid resistant bacteria, but large variations in survival rates have been shown for *E. coli* O157:H7 in acidified culture media³⁵ or in simulated gastric fluid (SGF)³⁶⁻³⁸. This heterogeneity may be explained by differences in culture conditions, bacterial strains and pH values used to simulate the gastric phase. Regarding the ileal compartment, we observed a loss of viability after a 2-h period of digestion, whereas a bacterial growth occurred in the late phase (i.e. after 240 min). Similar results have been previously obtained when EHEC bacteria were inoculated within food matrices in the TIM model^{15,39,40}. Bacterial growth at the end of digestion could be attributed to lower concentrations of bile salts due to their passive reabsorption. Finally, in the simulated colonic conditions, EDL933 was not able to colonize, probably through the barrier effect of gut microbiota, as previously shown by Duncan et al.⁴¹ and by recent studies from the laboratory^{42,43}. Altogether, our results suggest a potential ability of EHEC to colonize the human gut through a mechanism involving an important growth of the pathogen in the distal parts of the small intestine. Bacterial survival in the stomach, followed by growth in the distal compartments of the small intestine might account for the very low infectious dose reported for EHEC1.

EHEC strains must not only survive in the human GI tract but also orchestrate a complex machinery including expression of virulence determinants in response to localized gut microenvironments. Stx is known to be the main virulence trait of EHEC responsible for systemic complications, but the pathogen produces also a large number of proteins, which contribute to its establishment, persistence and tissue tropism. Colonization factors such as Long polar fimbriae (Lpf) are found to be involved in the key steps of EHEC pathogenesis, such as adhesion, translocation or inflammation^{44,45}. Genome analysis of EHEC O157:H7 reference strain EDL933 revealed the presence of two lpf operons, $lpfA_{OI-141}$ and $lpfA_{OI-154}$, also named lpf1 and $lpf2^{21}$. A third operon, $lpfA_{OI-113}$ has been identified in O113:H21 EHEC strains, commonly associated with sporadic cases of infection²⁶. We investigated by PCR the prevalence of $lpfA_{OI-141}$, $lpfA_{OI-154}$ and $lpfA_{OI-113}$ among a wide range of strains (n = 236) isolated from bovine feces, food and human. We showed that $lpfA_{OI-141}$ and $lpfA_{OI-154}$ were more prevalent in strains isolated from HUS patients, whereas $lpfA_{OI-113}$ was mainly associated with strains isolated from bovine feces. Our results are in accordance with those of others¹⁹⁻²¹ who reported that $lpfA_{OI-141}$ and $lpfA_{OI-154}$ were more prevalent in human samples and that the lpf gene was significantly associated with HUS. Herein, the analysis of the 236 strains (classified into the five seropathotypes according to association with severe diseases) revealed a positive correlation between the presence of $lpfA_{Ol-141}$ and $lpfA_{Ol-154}$ and seropathotype A (involved in severe human cases)⁴⁶, while $lpfA_{OI-113}$ was significantly associated with seropathotypes C to E (no link with disease). These data, in accordance with studies conducted by others^{47,48}, strengthen the role for $lpfA_{OI-141}$ and $lpfA_{OI-154}$ in human infection.



Figure 5. Proposed role of Lpf in EHEC pathogenicity. The figure summarizes the main results obtained from this study. The survival rate of EHEC is shown in red. In the gastric compartment EHEC can survive; while in the small intestinal compartments, mortality is followed by a bacterial growth at the end of digestion, in the large intestine, the pathogenic bacteria are not able to maintain and are progressively eliminated. The $lpfA_{OI-141}$ and $lpfA_{OI-154}$ gene expression profiles, analyzed throughout the simulated human digestive tract, are shown in blue and green respectively. lpf expression is increased during bacterial transit through the gastric and small intestine, mainly in the terminal ileum. Gastric pH and bile salts concentration in small intestine are hypothesized to be the factors inducing lpf expression. The absence of Lpf impairs EHEC ability to interact with ileal Peyer's patches. Our results suggest that EHEC might colonize the terminal ileum at the early stages of infection in humans, and that Lpf are involved in the interactions of EHEC with ileal Peyer's patches and are needed for an active translocation of the pathogen across M cells.

To date, regulation of EHEC lpf genes in the human digestive environment was only investigated in simplistic in vitro approaches. In our complete and sophisticated in vitro GI and gut models, lpfA_{OLI4} and lpfA_{OLI54} were highly expressed in the gastric and small intestinal environment, but not in the colon (Fig. 5). Here, we showed that in the gastric effluents, *lpfA*_{OI-141} and *lpfA*_{OI-154} were over-expressed at the beginning of digestion (from t0 to 10 min) when the pH was between 6 and 3. In the ileal effluents (pH 7.2), both *lpf* genes were expressed throughout digestion, being highly expressed at the end of the experiment simultaneously with bacterial growth. These results, obtained in dynamic models closely mimicking human digestion, confirm that the exponential growth phase, body temperature (37 °C) and pH close to the neutrality (pH 6.5) favor lpf expression⁴⁹. To further investigate the parameters influencing *lpf* expression in the human GI tract, we appreciated the effect of bile salts in batch cultures. As previously observed by others^{50,51}, we demonstrated that *lpf* mRNA levels exhibited a significant increase when bile salts were added in the media. Upregulation by bile salts could explain the significant increase of lpf mRNA levels in the distal small intestine (and not in the colon), associated with higher concentrations of bile salts in the ileum. In batch cultures, we demonstrated that *lpfA*_{OI-154} mRNA levels are significantly higher compared to $lpfA_{OI-141}$ in the presence of bile salts. This corroborates the results obtained in ligated pig intestine, where bile salts increased lpf2 but not lpf1 expression⁵⁰. In other pathogenic E. coli bacteria such as AIEC, bile salts have already been described as an activator of *lpf* transcription in a mechanism related to a transcriptional regulator, FhlA, only present in enteric bacteria⁵¹. In E. coli O157:H7, it has been shown that lpf operon expression is tightly controlled by global regulators such as histone-like nucleoid-structuring protein (H-NS) and LEE-encoded regulators^{52,53}, emphasizing the complexity of *lpf* genes regulation. Our data suggest that the ileum could be an important site for expression of EHEC adhesins such as Lpf, which genes can be induced even without direct contact with the host cells. This also indicates that EHEC might colonize this segment of the gut at the early stages of infection in humans.

Once EHEC bacteria have crossed the gastric and small intestinal barriers, they intimately interact with the host epithelium. We assessed the role of $lpfA_{OI-141}$ and $lpfA_{OI-154}$ in EHEC adhesion to intestinal cells in culture. In the conditions tested, O157:H7 EDL933 only slightly adhered to Caco-2 cells (<5% of bacterial inoculum) through a mechanism independent of lpf expression. With regard to the role of Lpf in bacterial adhesion, conflicting results are reported. Deletion of $lpfA_{OI-141}$ and/or $lpfA_{OI-154}$ genes led to a decrease in adhesion to epithelial cells^{21-23,27,54,55}, but this effect was observed *in vitro* only at early time points (at 3 h but not at 5 or 6 h), suggesting a role of lpf in the early stage of adhesion^{21,22}. In vivo in several animal models (rabbit, lamb, sheep, and pig), $lpfA_{OI-141}$ and $lpfA_{OI-154}$ mutants were recovered at significantly lower levels in the feces compared to the wild-type strain, showing a role of Lpf in EHEC O157:H7 colonization^{49,56,57}. However, lpf2 did not influence the ability of EHEC O157:H7 strain 86–24 to adhere to intestinal explants obtained from lambs⁴⁹. In addition, studies from other laboratories working on enteric pathogens such as *Citrobacter rodentium* (natural mouse pathogen used as a model for studying EHEC virulence), AIEC or *Salmonella* have shown that Lpf are not involved in the adhesion to various epithelial cells^{18,58,59}.

Apart from adhesion to epithelial cells, EHEC can also interact with Peyer's patches in the host epithelium. Using IVOC of human intestinal tissue, EHEC demonstrated a particular tropism for the FAE of the distal ileal Peyer's patches rich in M cells^{11,55}. In addition to EHEC, fourteen different species of pathogenic and non-pathogenic bacteria selectively adhere to and exploit the M cell transport mechanism to infect mucosal tissues and/or spread systemically^{60,61}. The mechanisms of interactions with M-cells involve invasin and internalin B, respectively in *Yersinia pseudotuberculosis*⁶² and *Listeria monocytogenes*⁶³. Recently, *E. coli* were reported to interact with Peyer's patches via the recognition by type I pili of glycoprotein 2 (GP2), which is specifically localized on apical plasma membrane of M cells⁶⁴. Previous studies have shown that type I fimbriae are not expressed in strains of *E. coli* serotype O157:H7 because of a 16 bp deletion in the *fimA* regulatory region^{32,65}. Such deletion was confirmed in the present study and lead us to speculate that adhesins other than type I pili are involved in EHEC tropism to M cells.

Here, we have shown by using complementary in vitro human M cell model and in vivo mice ileal loops, that *lpfA*_{OI-141} and *lpfA*_{OI-154} mediate EHEC interactions with Peyer's patches, leading to a significant reduction in the number of hemorrhagic Peyer's patches with lpf mutants compared to the wild-type strain. The role of EHEC Lpf in targeting Peyer's patches was further supported by the results obtained with the O6:H10 NV110 strain, which constitutively lacks lpf genes. The capacity of O6:H10 to interact with specialized M cells was significantly reduced compared to O157:H7 strain EDL933, whereas similar adhesion levels to intestinal epithelial cells were found for both strains. Lpf have also been identified as a key factor for Salmonella Typhimurium and AIEC in targeting Peyer's patches^{18,66}. We found that the trans-complementation of the double mutant led to a significant increase in EDL933 interactions with Peyer's patches compared to the wild-type strain. This could be linked to an overex-pression of *lpf* genes or to a deregulation of other factors. Lloyd *et al.*⁵⁷ observed that the *lpf1 lpf2* double mutant strain of O157:H7 86-24 showed an increased adhesion to Caco-2 cells compared to the parent strain, which resulted from an over-expression of curli on the bacterial surface. Although we did not observe such phenotype at the bacterial surface, this suggests that the regulatory pathways governing the expression of *lpf* and other fimbriae are inter-related. Advances have to be made in establishing the host binding partner for Lpf. Previous studies demonstrated in vitro that Lpf are involved in the binding of EHEC to extracellular matrix proteins, increasing the number of adherent EHEC bacteria to cultured intestinal cells^{23,67}. Such interactions might enhance colonization at sites where the mucosal barrier is injured by Shiga-toxins. Our results suggest that a specific receptor for Lpf may be expressed at the surface of Peyer's patches and M cells. These specific receptors have not been identified to date. Such investigations are hampered by the failure to visualize Lpf fimbrial structures and the lack of antibodies specific to Lpf. Our results (summarized in Fig. 5) demonstrate an important role of Lpf in EHEC pathogenicity and strengthen the hypothesis that, in the initial stages of colonization, EHEC preferentially infect the ileal region and subsequently colonize the large intestinal mucosa. We also demonstrated that Lpf are needed to target M cells in small intestinal Peyer's patches. A better understanding of Lpf-related events in the human gut, as provided in the present study, will be helpful for the development of early intervention strategy against EHEC infections.

Material and Methods

Bacterial strains, plasmids and culture conditions. Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. A collection of 236 STEC strains (for which the serotype and seropathotypes were previously described^{26,27}) was tested for the presence of *lpf* genes. Bacteria were grown overnight at 37 °C without shaking in LB broth, or DMEM medium (PAA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Lonza). When required, appropriate antibiotics were added to the media at the following final concentrations: kanamycin (PAA) 50 μ g/ml, ampicillin (PAA) 50 μ g/ml and chloramphenicol (PAA) 25 μ g/ml. L-Arabinose (Sigma-Aldrich) was used at a final concentration of 10 mM with trans-complemented mutants to promote induction of *lpf* genes cloned into the pBAD24 and pBAD33 vectors.

Prevalence of genes encoding lpf_{OI-141} , lpf_{OI-154} and lpf_{OI-113} in STEC strains. All STEC isolates were analyzed for the presence of genes encoding for Lpf_{OI-141} , Lpf_{OI-154} and Lpf_{OI-113} . The corresponding lpf_{OI-141} , lpf_{OI-154} and lpf_{OI-113} genes were amplified by PCR using the primers listed in Supplemental Table 1.

Survival and expression of *lpf* **genes under human simulated digestive conditions.** *Batch cultures with bile salts.* EHEC 0157:H7 EDL933 was grown without shaking at 37 °C in LB or DMEM medium

Strains or plasmids	Relevant characteristic (s)	stx genotype	Source or reference			
Strains						
O157:H7	Enterohemorragic <i>E. coli</i> O157:H7 reference strain EDL933	stx1+stx2+	ATCC 43895			
0157:H7- <i>ΔlpfA_{0I-141}</i>	EDL933 isogenic mutant with <i>lpfA</i> _{Ol-141} gene deleted, Km ^R	stx1+stx2+	Mutant generated in this study			
0157:H7- <i>ΔlpfA_{0I-154}</i>	EDL933 isogenic mutant with <i>lpfA</i> _{Ol-154} gene deleted, Km ^R	stx1+stx2+	Mutant generated in this study			
0157:H7- <i>ΔlpfA_{OI-141}/ ΔlpfA_{OI-154}</i>	EDL933 isogenic mutant with $lpfA_{OI-141}$ and $lpfA_{OI-154}$ genes deleted, Km ^R	stx1+stx2+	Mutant generated in this study			
O157:H7- <i>∆stx2</i>	EDL933 isogenic mutant with <i>stx2</i> gene deleted, Km ^R	stx1+stx2-	81			
O157:H7- <i>∆fliC</i>	EDL933 isogenic mutant with flagellar gene <i>fliC</i> deleted, Km ^R	stx1+stx2+	81			
O6:H10	Enterohemorragic <i>E. coli</i> O6:H10 strain NV206, naturally lacking <i>lpf</i> genes	stx1-stx2+	81			
STEC collection	236 STEC strains isolated from cattle, food and patients	NA	81			
K-12 C600	Non pathogenic E. coli	NA	Laboratory			
Plasmids						
pKOBEG	$\begin{array}{c} pBAD \ cloning \ vector \ harboring \ \lambda \ phage \\ red \gamma \beta \alpha \ operon, \ Cm^R \end{array}$	NA	71			
pBAD24	Cloning vector with arabinose inducible promoter, Amp ^R	NA	71			
pBAD33	Cloning vector with arabinose inducible promoter, Cm ^R	NA	71			
pBAD24-lpfA _{OI-141}	pBAD24 harboring the 537-bp NcoI-PstI fragment containing the entire <i>lpfA</i> _{OI-141} gene	NA	Plasmid generated in this study			
pBAD33-lpfA _{OI-154}	pBAD33 harboring the 603-bp HindIII-XbaI fragment containing the entire <i>lpfA</i> _{OI-154} gene	NA	Plasmid generated in this study			

Table 1. Bacterial strains and plasmids. NA, not applicable; $lpfA_{OI-141}$, long polar fimbrae, subunit A from O island 141; $lpfA_{OI-154}$, long polar fimbrae, subunit A from O island 154; *stx1*, Shiga-toxin 1; *stx2*, Shiga-toxin 2; ^Rantibiotic resistant mutant; Km, kanamycin; Amp, ampicillin; Cm, chloramphenicol.

(PAA), supplemented or not with 2% bile salts (50% cholic acid sodium salt and 50% deoxycholic acid sodium salt; Sigma) until exponential (3 h) or stationary growth phase. Samples were collected to determine *lpf* expression. Three independent experiments were performed.

TIM Gastric and Small Intestinal System. Human upper digestive tract conditions were reproduced by the dynamic TNO GastroIntestinal model (TIM, TNO) in which four serial compartments simulate the stomach and the three segments of the small intestine, *i.e.* duodenum, jejunum, and ileum⁶⁸. The main parameters of human digestion, are reproduced as accurately as possible, based upon *in vivo* data (Supplemental Table 2). TIM was programmed to reproduce the GI conditions of a healthy adult after intake of a glass of water (Supplemental Table 2). Mineral water (200 ml) was experimentally inoculated with EHEC O157:H7 strain EDL933 (10⁷ CFU/ml). Two types of *in vitro* digestions were performed: gastric digestions where only the gastric compartment was set-up (total duration of 60 min) and GI digestions using the entire TIM model (total duration of 300 min). Samples were taken in the initial bacterial suspension (t0) and regularly collected in the different compartments during GI digestions to determine EHEC survival. Gastric and ileal effluents were kept on ice and pooled on 0–10, 10–20, 20–40 and 40–60 min for gastric digestion and hour-by-hour for GI digestion. Samples were taken in each fraction and stored at -80 °C until RNA extraction for the determination of *lpf* expression. Four independent experiments were performed.

ARCOL large intestinal model. Human colonic conditions were simulated in the ARtificial COLon (ARCOL). ARCOL is a one-stage fermentation system used under semi-continuous conditions (Applikon). The ARCOL model was set-up to mimic the average conditions found in the colon of a healthy human adult (Supplemental Table 2). The bioreactor was inoculated with fresh feces collected from a healthy individual with no history of antibiotic treatment 3 months before the study. EHEC O157:H7 strain EDL933 was inoculated in the bioreactor after a 4-day stabilization period (10⁷CFU/ml). Fermentations were carried out in triplicate using fresh feces collected from three adult volunteers. Samples were regularly collected from the colonic medium to determine the survival kinetic of the pathogen and *lpf* expression.

EHEC survival. EDL933 survival in the TIM (gastric and ileal compartments) and in the ARCOL models was determined by direct plating onto LB agar and qPCR analysis using stx1 specific primers (Supplemental Table 1)⁴². Results were expressed as percentages of initial intake and cross-compared to those obtained with a theoretical non-absorbable transit marker, blue dextran, giving a 100% survival rate for bacteria. The concentrations of blue dextran used as a transit marker in the TIM system were determined colorimetrically using

a spectrophotometer (DU[®]640 B Spectrophotometer, Beckman Coulter, Ville-pinte, France) at $\lambda = 595$ nm. In the ARCOL model, survival rates were assessed by comparing the profiles obtained for bacteria with that of a mathematical theoretical marker that simulates the behavior of an inert (i.e., non-degraded and non-absorbed) compound. Its removal from the bioreactor was described by the formula : $C_t = C_0 \times e^{(-t/\tau)}$, where C_t is the concentration of the marker at time t, C_0 its initial concentration, t the time of fermentation, and τ the residence time⁶⁹. Bacterial counts below that of the transit marker reflect cell mortality, while counts above the transit marker are indicative of bacterial growth.

Expression of lpf genes. Total RNA was extracted from batch cultures and digestive samples (gastric and ileal effluents and colonic medium) using TRIzol[®] reagent method adapted from Toledo-Arana et $al.^{70}$. RNAs were reversely transcribed using the First-Strand cDNA synthesis kit (Takara) and qRT-PCR was performed using SYBR Green qPCR Master Mix (Roche) on a Biorad qPCR system with specific primers listed in Supplemental Table 1. *Enterobacteriaceae* 16 S was used as internal control for quantification of mRNA expression. Fold induction was calculated using Ct method as follows:

$$\Delta\Delta Ct = \left(Ct_{target gene} - Ct_{housekeeping gene}\right)_{treatment} - \left(Ct_{target gene} - Ct_{housekeeping gene}\right)_{non treatment}$$

and the final data were derived from $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Characterization of type I pili expression in EHEC 0157:H7 EDL933. *Preparation of fimbrial crude extracts.* EHEC 0157:H7 EDL933 and AIEC LF82 (as a positive control) were grown for 3 h in DMEM (PAA) with 2% of bile salts. Detailed step-by-step protocols for pili extraction and immunoblotting analysis can be found in the Supplemental Methods.

Transmission electron microscopy. Type I pili and bacterial integrity of *lpf* mutants were visualized by transmission electron microscopy (TEM). EHEC O157:H7 strain EDL933 and AIEC strain LF82 (as a positive control) were grown overnight in LB broth at 37 °C without shaking. A drop of the culture was placed for 2 min on carbon-Formvar copper grids (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, England) and negatively stained during 30 s with acid phosphotungstic pH 6.0. Grids were examined with Hitachi H-7650 transmission electron microscope.

Construction and characterization of *lpf* **mutants.** Construction of isogenic mutants and transcomplementationh. Isogenic mutants of strain EDL933 deleted of $lpfA_{OI-141}$ (*lpfA* from O island 141) and/or *lpfA*_{OI-154} (*lpfA* from O island 154) were generated using the PCR method described by Datsenko and Wanners⁷¹ and modified by Chaveroche *et al.*⁷² (see details in Supplemental Methods).

Bacterial growth kinetics and motility assay. Bacterial strains (wild-type EDL933, *lpf* isogenic mutants, trans-complemented strains, and O6:H10 strain NV110, naturally deficient in Lpf^{33,34}) were grown overnight at 37 °C without shaking on LB broth. Bacterial growth was monitored for 12 h. For mobility assays, 0.5μ l of the overnight cultures were inoculated in the middle of 0.3% LB agar plates. After incubation (24 h, 37 °C), motility was assessed qualitatively by examining the circular swim formed by the growing motile bacterial cells. The EDL933- Δ *fliC* isogenic mutant was used as a negative control.

Shiga toxin production. To quantify Stx production, bacterial supernatant of an overnight culture in LB broth were tested for cytotoxicity in the Vero cell assay, as previously described^{15,34} (see details in Supplemental Methods).

Role of Lpf in the interactions of EHEC strains with the intestinal epithelium. Adhesion assays. The human colorectal adenocarcinoma cell-line Caco-2 (ATCC HTB37) was grown at 37 °C under 5% CO_2 in complete DMEM (PAA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Lonza), 4 mM L-glutamine (PAA), 100 U/ml penicillin (PAA) and 100 mg/ml streptomycin (PAA). All bacterial strains (wild-type EDL933, *lpf* isogenic mutants, trans-complemented mutants and O6:H10 strain NV110) were incubated for 3 h at 37 °C in DMEM (PAA) in the presence of 2% bile salt before cell infection. *E. coli* K12-C600 and AIEC LF82 were used as negative and positive controls, respectively. Each experiment was performed as described previously³⁰. Briefly, after three washes with PBS, Caco-2 cells were infected with bacteria grown for 3 h at 37 °C at a multiplicity of infection (MOI) of 100. After 3 h, non-adherent bacteria were removed from the cells by three washes with PBS. To quantify the number of bacteria adherent to epithelial cells, the cells were scraped with 1% triton X-100 (Sigma) in PBS, and serial 10 fold dilutions were plated overnight at 37 °C onto LB agar plates.

Translocation across M cell monolayers. The *in vitro* M cell co-culture model was first developed by Kerneis *et al.*⁷³ and later adapted by Gullberg *et al.*⁷⁴. The human colorectal adenocarcinoma cell-line Caco-2 cl1⁷⁴ was grown as previously described for the adhesion assays. The human Burkitt's lymphoma cell-line Raji B (ECACC 85011429) was grown in complete RPMI-1640 medium (PAA) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 8 mM L-glutamine (PAA), 100 U/ml penicillin (PAA) and 100 mg/ml streptomycin (PAA). A total of 1.10⁶ Caco-2 cl1 cells per ml were seeded onto the apical aspect of TranswellTM filters (Millipore Ltd) previously coated with BD MatrigelTM. Cells were carefully cultured for 17 days until they reached a fully differentiated phenotype. Then 5·10⁵ Raji-B cells were added to the basolateral compartment of Caco-2 cl1 monolayers, and co-culture

was maintained for 4–6 days. Monocultures of Caco-2 cl1 cells on matched filter supports were used as control. For translocation assays, apical surface of M-cells or Caco-2 cl1 were infected with 1·10⁷ EHEC bacteria per TranswellTM. Samples from basolateral media were collected every 2 h for 6 h and 10-fold dilutions were plated onto LB agar. The integrity of cell monolayers was tested by monitoring trans-epithelial electrical resistance (TEER) with a Millicell[®]-ERS (Millipore). Each experiment was performed in triplicate.

Ethics statement. Work on animals was performed in compliance with French and European regulations on care and protection of laboratory animals (EC Directive 2010/63, French Law 2013–118, February 6, 2013). All experiments were approved by the Comité d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale Auvergne (CEMEAA), registered under the reference C2EA-02. All efforts were made to minimize animal suffering.

Animals. Adult (5–6 weeks old) male FVB mice were purchased from Charles River Laboratories. Animals were housed in the Université d'Auvergne Medical School animal facility accredited by the French Ministry of Agriculture for performing experiments on live rodents (Agreement 2014 C63 113 15).

Mice ileal loop assay. In vivo interactions of EHEC bacteria with Peyer's patches were studied using mouse ileal loops, as previously described by Hitotsubashi *et al.*⁷⁵. Briefly, mice (n = 10) were starved 24 h before operation, anesthetized and the abdominal cavity was exteriorized through a midline incision. A 6 cm ileal segment with two to three Peyer's patches was isolated and ligated, and then inoculated by mixed inoculi comprising equivalent numbers $(5\cdot10^8 \text{ CFU/ml})$ of the EDL933 wild-type strain in combination with either *lpf* isogenic mutants, transcomplemented mutants or the O6:H10 strain (input). Five hours after injection, mice were euthanized by cervical dislocation according to animal care procedure. Ileal mucosa with or without Peyer's patches were treated with gentamicin $20 \,\mu$ g/ml for 1 h. Intestinal samples were then crushed with an Ultra-Turrax in the presence of 0.1% Triton X-100 and the number of intracellular bacteria was determined by plating on appropriate selective media (output). Competitive index (CI) analysis was performed to provide a sensitive measurement of the relative degree of attenuation⁷⁶. CI is defined as the ratio of the tested strain (mutant, trans-complemented or O6:H10) to O157:H7 wild-type strain in the output, divided by the ratio of the two strains in the input. Each Peyer's patch was also macroscopically examined to determine its hemorrhagic status.

Statistical analysis. During TIM and ARCOL experiments, significant differences in survival between time points were tested using a non-parametric analysis of repeated measures with the "f1.ld.f1" function of the R package "nparLD"⁷⁷ in R 3.2.4⁷⁸. In case of significant difference compared to the transit marker, the function "npar.t.test" of the package "nparcomp"⁷⁹ was used for each time point. In case of a significant interaction effect, a linear mixed effect models with a random intercept on experiments to take account of repeated measures was performed and followed by function "diffIsmeans" of the package "lmerTest"⁸⁰. The kinetics of *lpf* genes expression in the TIM and ARCOL models were tested with the "ld.f1" function of the R package "nparLD". In case of a significant time effect, pairwise comparisons with Bonferroni adjustment were performed. The significance of differences in the ability of adhesion between the bacteria strains and for *lpf* expression in bach cultures were tested using Dunnett's test. For experiments with multiple treatment groups (*in vitro* M cell assays), a non-parametric assay of repeated measures was performed, followed by Tukey's pairwise comparisons. Significance differences for competitive index in *in vivo* ileal loops assays was done by nonparametric Wilcoxon signed rank test. The independence between treatment and hemorrhagic status of Peyer's patches was tested by chi-square with Yates correction.

References

- 1. Karmali, M. A., Gannon, V. & Sargeant, J. M. Verocytotoxin-producing Escherichia coli (VTEC). Vet. Microbiol. 140, 360–370 (2010).
- Rangel, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P. M. & Swerdlow, D. L. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 603–609 (2005).
- Karmali, M. A. et al. Association of Genomic O Island 122 of Escherichia coli EDL 933 with Verocytotoxin-Producing Escherichia coli Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease. J. Clin. Microbiol. 41, 4930–4940 (2003).
- Wong, C. S., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Watkins, S. L. & Tarr, P. I. The Risk of the Hemolytic–Uremic Syndrome after Antibiotic Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 Infections. N. Engl. J. Med. 342, 1930–1936 (2000).
- House, B. et al. Acid-stress-induced changes in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157: H7 virulence. Microbiol. Read. Engl. 155, 2907–2918 (2009).
- Kus, J. V. *et al.* Bile salts induce resistance to polymyxin in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* 193, 4509–4515 (2011).
 Hong, W., Wu, Y. E., Fu, X. & Chang, Z. Chaperone-dependent mechanisms for acid resistance in enteric bacteria. *Trends Microbiol.* 20, 328–335 (2012).
- Wong, A. R. C. *et al.* Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Mol. Microbiol.* 80, 1420–1438 (2011).
- 9. Pennington, H. Escherichia coli O157. The Lancet 376, 1428-1435 (2010)
- Lewis, S. B., Cook, V., Tighe, R. & Schüller, S. Enterohemorrhagic Escherichia coli colonization of human colonic epithelium in vitro and ex vivo. Infect. Immun. 83, 942–949 (2015).
- 11. Phillips, A. D. *et al.* Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut* **47**, 377–381 (2000).
- 12. Chong, Y. *et al.* Human intestinal tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7 initial colonization of terminal ileum and Peyer's patches and minimal colonic adhesion *ex vivo*. *Microbiology* **153**, 794–802 (2007).
- Kikukawa, R. et al. Anatomical and histological characterization of ileal and jejunal Peyer's patch in lesser mouse deer (Tragulus javanicus). Vet. Immunol. Immunopathol. 149, 103–107 (2012).
- Pickard, J. M. & Chervonsky, A. V. Sampling of the Intestinal Microbiota by Epithelial M Cells. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12, 331–339 (2010).
 Etienne-Mesmin, L. *et al.* Interactions with M Cells and Macrophages as Key Steps in the Pathogenesis of Enterohemorragic *Escherichia coli* Infections. *PLoS ONE* 6, e23594 (2011).
- 16. Bäumler, A. J. & Heffron, F. Identification and sequence analysis of lpfABCDE, a putative fimbrial operon of Salmonella typhimurium. *J. Bacteriol.* **177**, 2087–2097 (1995).

- Bäumler, A. J., Tsolis, R. M. & Heffron, F. The lpf fimbrial operon mediates adhesion of Salmonella typhimurium to murine Peyer's patches. Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 279–283 (1996).
- Chassaing, B. et al. Crohn disease-associated adherent-invasive E. coli bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. J. Clin. Invest. 121, 966–975 (2011).
- Torres, A. G. et al. Genes Related to Long Polar Fimbriae of Pathogenic Escherichia coli Strains as Reliable Markers To Identify Virulent Isolates. J. Clin. Microbiol. 47, 2442–2451 (2009).
- 20. Perna, N. T. et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7. Nature 409, 529–533 (2001).
- Torres, A. G. et al. Identification and Characterization of lpfABCC'DE, a Fimbrial Operon of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. Infect. Immun. 70, 5416–5427 (2002).
- Torres, A. G., Kanack, K. J., Tutt, C. B., Popov, V. & Kaper, J. B. Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic E. coli strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 333–344 (2004).
- Farfan, M. J., Cantero, L., Vidal, R., Botkin, D. J. & Torres, A. G. Long Polar Fimbriae of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Bind to Extracellular Matrix Proteins. *Infect. Immun.* 79, 3744–3750 (2011).
- Vergara, A. F., Vidal, R. M., Torres, A. G. & Farfan, M. J. Long polar fimbriae participates in the induction of neutrophils transepithelial migration across intestinal cells infected with enterohemorrhagic E. coli O157:H7. Front. Cell. Infect. Microbiol. 4, 185 (2014).
- Farfan, M. J., Cantero, L., Vergara, A., Vidal, R. & Torres, A. G. The long polar fimbriae of STEC O157:H7 induce expression of proinflammatory markers by intestinal epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 152, 126–131 (2013).
- Doughty, S. *et al.* Identification of a Novel Fimbrial Gene Cluster Related to Long Polar Fimbriae in Locus of Enterocyte Effacement-Negative Strains of Enterohemorrhagic *Escherichia coli. Infect. Immun.* **70**, 6761–6769 (2002).
- Ideses, D., Biran, D., Gophna, U., Levy-Nissenbaum, O. & Ron, E. Z. The lpf operon of invasive *Escherichia coli. Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 295, 227–236 (2005).
- Karmali, M. A. et al. Association of genomic O island 122 of Escherichia coli EDL 933 with verocytotoxin-producing Escherichia coli seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J. Clin. Microbiol. 41, 4930–4940 (2003).
- Pradel, N. *et al.* Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1023–1031 (2000).
 Pradel, N. *et al. In vitro* adhesion properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and humans. *Front.*
- Microbiol 6 (2015).
- 31. Hase, K. *et al.* Uptake through glycoprotein 2 of FimH + bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* **462**, 226–230 (2009).
- 32. Shaikh, N., Holt, N. J., Johnson, J. R. & Tarr, P. I. Fim operon variation in the emergence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: an evolutionary and functional analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **273**, 58–63 (2007).
- Pradel, N., Leroy-Setrin, S., Joly, B. & Livrelli, V. Genomic Subtraction To Identify and Characterize Sequences of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli O91:H21. Appl. Environ. Microbiol. 68, 2316–2325 (2002).
- Pradel, N. et al. Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Isolated from Cattle, Food, and Children during a One-Year Prospective Study in France. J. Clin. Microbiol. 38, 1023–1031 (2000).
- Takumi, K., de Jonge, R. & Havelaar, A. Modelling inactivation of *Escherichia coli* by low pH: application to passage through the stomach of young and elderly people. *J. Appl. Microbiol.* 89, 935–943 (2000).
- Arnold, K. W. & Kaspar, C. W. Starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. Appl. Environ. Microbiol. 61, 2037–2039 (1995).
- 37. Tamplin, M. L. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in simulated human gastric fluid. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 320–325 (2005).
- Bergholz, T. M. & Whittam, T. S. Variation in acid resistance among enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in a simulated gastric environment. J. Appl. Microbiol. 102, 352–362 (2007).
- Miszczycha, S. D. et al. Survival of Escherichia coli O26:H11 exceeds that of Escherichia coli O157:H7 as assessed by simulated human digestion of contaminated raw milk cheeses. Int. J. Food Microbiol. 172, 40–48 (2014).
- 40. Arroyo-López, F. N. et al. Survival of pathogenic and lactobacilli species of fermented olives during simulated human digestion. Front. Microbiol. 5 (2014).
- Duncan, S. H., Louis, P., Thomson, J. M. & Flint, H. J. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol.* 11, 2112–2122 (2009).
- Thévenot, J. et al. Enterohemorrhagic Escherichia coli infection has donor-dependent effect on human gut microbiota and may be antagonized by probiotic yeast during interaction with Peyer's patches. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1–14, doi: 10.1007/s00253-015-6704-0 (2015).
- 43. Thévenot, J. *et al.* Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Survival in an *In Vitro* Model of the Human Large Intestine and Interactions with Probiotic Yeasts and Resident Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 1058–1064 (2013).
- 44. McWilliams, B. D. & Torres, A. G. EHEC Adhesins. Microbiol. Spectr. 2, EHEC-0003-2013 (2014).
- 45. Ross, B. N., Rojas-Lopez, M., Cieza, R. J., McWilliams, B. D. & Torres, A. G. The Role of Long Polar Fimbriae in *Escherichia coli* O104:H4 Adhesion and Colonization. *PloS One* **10**, e0141845 (2015).
- Gomes, T. A. T. et al. Adhesin-Encoding Genes from Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Are More Prevalent in Atypical than in Typical Enteropathogenic E. coli. J. Clin. Microbiol. 49, 3334–3337 (2011).
- Toma, C. et al. Distribution of Putative Adhesins in Different Seropathotypes of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 42, 4937–4946 (2004).
- 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. *Res. Microbiol.* 157, 153–161 (2006).
- Torres, A. G. *et al.* Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae (LPF) of *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 177–185 (2007).
- Yin, X. et al. Adherence and associated virulence gene expression in acid-treated Escherichia coli O157:H7 in vitro and in ligated pig intestine. Microbiol. Read. Engl. 158, 1084–1093 (2012).
- Chassaing, B., Etienne-Mesmin, L., Bonnet, R. & Darfeuille-Michaud, A. Bile salts induce long polar fimbriae expression favouring Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* interaction with Peyer's patches. *Environ. Microbiol.* 15, 355–371 (2013).
- Rojas-López, M. et al. Regulatory control of the Escherichia coli O157:H7 lpfl operon by H-NS and Ler. J. Bacteriol. 193, 1622–1632 (2011).
 Torres, A. G. et al. Ler and H-NS, Regulators Controlling Expression of the Long Polar Fimbriae of Escherichia coli O157:H7. J.
- Bacteriol. 189, 5916–5928 (2007). 54. Torres, A. G., Slater, T. M., Patel, S. D., Popov, V. L. & Arenas-Hernández, M. M. P. Contribution of the Ler- and H-NS-Regulated
- Iorres, A. G., Stater, I. M., Patel, S. D., Popov, V. L. & Arenas-Hernandez, M. M. P. Contribution of the Ler- and H-NS-Regulated Long Polar Fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 during Binding to Tissue-Cultured Cells. *Infect. Immun.* 76, 5062–5071 (2008).
- Fitzhenry, R. *et al.* Long polar fimbriae and tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7. *Microbes Infect.* 8, 1741–1749 (2006).
 Jordan, D. M. *et al.* Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 *in vivo. Infect. Immun.* 72, 6168–6171
- (2004).
 (2004).
 T Lloyd S L et al. A Double. Long Polar Fimbria Mutant of Escherichia coli Q157:H7 Expresses Curli and Exhibits Reduced In Viv.
- Lloyd, S. J. et al. A Double, Long Polar Fimbria Mutant of Escherichia coli O157:H7 Expresses Curli and Exhibits Reduced In Vivo Colonization. Infect. Immun. 80, 914–920 (2012).
- Allen-Vercoe, E. & Woodward, M. J. The Role of Flagella, But not Fimbriae, in the Adherence of Salmonella Enterica Serotype Enteritidis to Chick Gut Explant. J. Med. Microbiol. 48, 771–780 (1999).

- Tatsuno, I. *et al.* The lpf Gene Cluster for Long Polar Fimbriae Is Not Involved in Adherence of Enteropathogenic *Escherichia coli* or Virulence of Citrobacter rodentium. *Infect. Immun.* 74, 265–272 (2006).
- Knight, P., Campbell, B. J. & Rhodes, J. M. Host-bacteria interaction in inflammatory bowel disease. *Br. Med. Bull.* 88, 95–113 (2008).
 Neutra, M. R., Mantis, N. J., Frey, A. & Giannasca, P. J. The composition and function of M cell apical membranes: implications for microbial pathogenesis. *Semin. Immunol.* 11, 171–181 (1999).
- Clark, M. A., Hirst, B. H. & Jepson, M. A. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of Yersinia pseudotuberculosis to mouse Peyer's patch M cells. *Infect. Immun.* 66, 1237–1243 (1998).
- 63. Chiba, S. *et al.* Listerial invasion protein internalin B promotes entry into ileal Peyer's patches *in vivo. Microbiol. Immunol.* 55, 123–129 (2011).
- 64. Hase, K. *et al.* Uptake through glycoprotein 2 of FimH+ bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* **462**, 226–230 (2009).
- Roe, A. J., Currie, C., Smith, D. G. & Gally, D. L. Analysis of type 1 fimbriae expression in verotoxigenic *Escherichia coli*: a comparison between serotypes O157 and O26. *Microbiol. Read. Engl.* 147, 145–152 (2001).
- Sansonetti, P. J. & Phalipon, A. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. Semin. Immunol. 11, 193–203 (1999).
- 67. Coppens, F. *et al.* Structural and adhesive properties of the long polar fimbriae protein LpfD from adherent-invasive *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **71**, 1615–1626 (2015).
- Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R. & Huis In 'T Veld, J. H. J. A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *ATLA Altern. Lab. Anim.* 23, 197–209 (1995).
- 69. Danckwerts, P. V. Continuous flow systems: Distribution of residence times. Chem. Eng. Sci. 2, 1–13 (1953).
- 70. Toledo-Arana, A. *et al*. The Listeria transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* **459**, 950–956 (2009).
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6640–6645 (2000).
 Chaveroche, M.-K., Ghigo, J.-M. & d'Enfert, C. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus Aspergillus
- Nucleic Acids Res. 28, e97 (2000).
 Kernéis, S., Bogdanova, A., Kraehenbuhl, J.-P. & Pringault, E. Conversion by Peyer's Patch Lymphocytes of Human Enterocytes into
- M Cellis that Transport Bacteria. Science 277, 949–952 (1997).
 Gullberg, E. et al. Expression of Specific Markers and Particle Transport in a New Human Intestinal M-Cell Model. Biochem.
- *Biophys. Res. Commun.* **279**, 808–813 (2000).
- Hitotsubashi, S., Fujii, Y., Yamanaka, H. & Okamoto, K. Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Infect. Immun.* 60, 4468–4474 (1992).
- Beuzón, C. R. & Holden, D. W. Use of mixed infections with Salmonella strains to study virulence genes and their interactions in vivo. Microbes Infect. 3, 1345–1352 (2001).
- Noguchi, K., Gel, Y. R., Brunner, E. & Konietschke, F. nparLD: An R Software Package for the Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments. (2012). Available at: http://www.goedoc.uni-goettingen.de/goescholar/handle/1/9492 (Accessed: 21st January 2015).
- 78. Team, R. C. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available online at: http. Www.R-Proj.Org (2014).
- 79. Konietschke, F. nparcomp: Multiple Comparisons and Simultaneous Confidence Intervals. (2014).
- 80. Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B. & Christensen, R. H. B. Imer Test: tests in linear mixed effects models. R package version 2.0-20 (2015).
- Gobert, A. P. *et al.* Shiga Toxin Produced by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Inhibits PI3K/NF-κB Signaling Pathway in Globotriaosylceramide-3-Negative Human Intestinal Epithelial Cells. *J. Immunol.* **178**, 8168–8174 (2007).

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conseil Régional Auvergne (grant CPER T2ANSH ASTERISK, Auvergne STEC Risque) to C.C., EA CIDAM, and UMR INSERM/Université d'Auvergne U1071 USC-INRA 2018. We thank Sandrine Chalancon, Mathilde Delpeuch and Julie Mabru for their technical help during experiments. We thank Juan Noriega Tejada (Institute for Biomedical Sciences, Georgia State University, Atlanta, Georgia) for critical and reading of the manuscript. We also thank Christelle Blavignac from the Centre Imagerie Cellulaire Santé for Microscopy experiments.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: C.C., L.E.-M., J.T., A.R., S.R., B.C., A.D.-M., N.B., S.B.-D. and V.L.; Performed the experiments: C.C., L.E.-M., J.T., A.R., S.R. and B.C.; Analyzed the data: C.C., L.E.-M. and J.T.; Wrote the paper: C.C., L.E.-M., S.B.-D. and V.L. All the authors approved the final manuscript as submitted.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Cordonnier, C. *et al.* Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis: role of Long polar fimbriae in Peyer's patches interactions. *Sci. Rep.* 7, 44655; doi: 10.1038/srep44655 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

© The Author(s) 2017

Supplementary informations

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis: role of Long Polar Fimbriae in Peyer's patches interactions

Charlotte Cordonnier^{1,2}, Lucie Etienne-Mesmin^{1,2,3}, Jonathan Thévenot^{1,2,4}, Amandine Rougeron¹, Sandra Rénier¹, Benoit Chassaing^{1,3}, Arlette Darfeuille-Michaud¹⁺, Nicolas Barnich¹, Stéphanie Blanquet-Diot², Valérie Livrelli^{1,5}*

⁺In memoriam

¹Université Clermont Auvergne, Inserm U1071, M2iSH "Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte", USC-INRA 2018, F-63000 Clermont-Ferrand, France
²Université Clermont Auvergne, MEDIS "Microbiologie Environnement DIgestif Santé" », F-63000 Clermont-Ferrand, France
³current address: Institute for Biomedical Sciences, Georgia State University, Atlanta, GA, 30303, USA
⁴current address: STLO, "Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf " Agrocampus Ouest, INRA, Rennes, 35042, France

⁵CHU Clermont-Ferrand, Service de Bactériologie, Parasitologie Mycologie, Clermont-Ferrand, 63000, France

*Corresponding author E-mail: valerie.livrelli@udamail.fr (VL)
Supplemental Methods

Detection of promoter deletion in *fim* **operon.** The 16 bp deletion in the *fim* promoter resulting in the absence of expression of type I pili was investigated by PCR as previously described by Shaikh *et al.*¹. Primers A and B (Supplemental Table 1) produce a 952 bp amplicon if the deletion is absent, but no amplicon in the presence of the deletion. Primers C and B (Supplemental Table 1) produce a 936 bp amplicon if the deletion is present in the *fim* operon.

Preparation of fimbrial crude extracts. EHEC O157:H7 EDL933 and AIEC LF82 (as a positive control) were grown for 3 h in DMEM (PAA) with 2% of bile salts. After centrifugation (10,000 g, 10 min, 4°C), bacterial pellets were washed in 5 mM Tris 5% NaCl, then centrifuged using same conditions. Pellets were suspended in 5 mM Tris and bacterial surface proteins were sheared off with a homogenizer set at low speed during 2 min (on ice, 3 times). Bacterial cells and debris were sedimented (10,000 g, 10 min, 4°C), while the supernatants constituting the crude extract of bacterial surface proteins were centrifuged (27,000 g, 30 min, 4°C). Pili extracts were obtained as a pellet after ultracentrifugation (270,000 g, 2 h, 4°C). After solubilization in 5 mM Tris buffer (overnight, 4°C), fimbriae were precipitated with 0.1 M MgCl₂ (3 h, 4°C). Suspensions were centrifuged in PBS then subjected to depolymerization by trifluoroacetic acid (TFA) hydrolysis. Samples were acidified to pH 2 with final 0.16% TFA, heated at 100°C for 5 min, cooled and neutralized with NaOH before immunoblotting analysis

Immunoblotting. Fimbrial crude extracts were incubated with 4X Laemmli buffer containing 10% mercaptoethanol (3 min, 100°C), then resolved on a 12% SDS-PAGE followed by electroblotting onto nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Sciences) using a Trans-Blot® TurboTM Blotting System (Bio-Rad). One percent of bovine serum albumin (BSA) in TBS-T (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) was used for diluting antibodies and blocking non-specific binding to nitrocellulose membrane. Type I pili were detected by Western blotting using the primary anti-pili polyclonal antibody aF1 from rabbit (1:5000) and the secondary monoclonal HRP-conjugated anti-rabbit IgG from goat (1:5000). The blot was developed using enhanced chemiluminescence reagent (Bio-Rad).

Yeast agglutination assay. EHEC O157:H7 strain EDL933 and AIEC strain LF82 (as a positive control) were cultured in static LB broth at 37°C overnight. Bacterial cells were collected by centrifugation (5,000 g, 10 min, room temperature) and pellets were resuspended in 100 μ l of 1X PBS. Subsequently, 50 μ l of a 2% (vol/vol) suspension of *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma) and an equal amount of undiluted or serial dilutions (from $\frac{1}{2}$ to $\frac{1}{20}$) of bacterial cells were mixed in 96-well plate. After 1 h incubation, visible agglutination was determined macroscopically.

Construction of isogenic mutants and transcomplementation. For double mutant $\Delta lpfA_{OI-141}/\Delta lpfA_{OI-154}$ generation, kanamycin cassette was excised using pcp20 plasmid after the first gene deletion². Primers used are listed in Supplemental Table 1. For transcomplementation assays, PCR products containing the entire major fimbrial subunit $lpfA_{OI-141}$ or $lpfA_{OI-154}$ were cloned into the pBAD24 and pBAD33 vectors, respectively, and introduced in their respective mutant strain as previously described³.

Shiga toxin production. EDL933- $\Delta stx2$ was used as a negative control. The Stx titre was expressed as the reciprocal of the highest filtrate dilution that cause 50% cell detachment after 24 h incubation, as judged by the dye density and by microscopic observation. Purified Stx2 (Toxin Technology) was used to estimate the range of toxin production. Each experiment was performed three times.

Supplemental References

- Shaikh, N., Holt, N. J., Johnson, J. R. & Tarr, P. I. Fim operon variation in the emergence of Enterohemorrhagic Escherichia coli: an evolutionary and functional analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 273, 58–63 (2007).
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6640–6645 (2000).
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* 177, 4121–4130 (1995).

•
 ъ

		No. of lpf-positive strains (%)									
Origin	Total no. of strains (%)	<i>lpf₀₁₋₁₄₁</i> +	<i>lpf₀₁₋₁₅₄</i> +	lpf 01-113 ⁺	lpf ₀₁₋₁₄₁ +	lpf ₀₁₋₁₅₄ +	lpf ₀₁₋₁₁₃ ⁺	lpf ₀₁₋₁₄₁ */ lpf ₀₁₋₁₅₄ *	lpf ₀₁₋₁₄₁ */ lpf ₀₁₋₁₁₃ *	lpf ₀₁₋₁₅₄ */ lpf ₀₁₋₁₁₃ *	lpf ₀₁₋₁₄₁ ⁺ /lpf ₀₁₋₁₅₄ ⁺ / lpf ₀₁₋₁₁₃ ⁺
HUS and HC	27 (11.4)	9 (3.8)	21 (8.9)	8 (3.4)	0 (0)	9 (3.8)	4 (1.7)	9 (3.4)	0 (0)	3 (1.3)	1 (0.4)
Asymptomatic children	10 (4.2)	0 (0)	$0(0)^{\beta}$	6 (2.5)	0 (0)	0 (0)	6 (2.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0(0)
Food	24 (10.2)	3 (1.3)	3 (1.3) ^β	17 (7.2) ^α	0 (0)	0 (0)	16 (6.8)	2 (0.8)	0 (0)	0 (0)	1 (0.4)
Bovine feces	175 (74.2)	$3(1.3)^{\beta}$	$6(2.5)^{\beta}$	112 (47.5) ^α	0 (0)	0 (0)	109 (46.2)	3 (1.3)	0 (0)	3 (1.3)	0 (0)
TOTAL	236 (100)	15 (6.4)	30 (12.7)	143 (60.6)	0 (0)	9 (3.8)	135 (57.2)	13 (5.5)	0 (0)	6 (2.5)	2 (0.8)

B

Seropathotype		No. of lpf-positive strains (%)									
	Total no. of strains (%)	<i>lpf₀₁₋₁₄₁</i> +	<i>lpf₀₁₋₁₅₄</i> +	<i>lpf₀₁₋₁₁₃</i> +	lpf ₀₁₋₁₄₁ +	lpf ₀₁₋₁₅₄ ⁺	lpf ₀₁₋₁₁₃ ⁺	lpf ₀₁₋₁₄₁ +/ lpf ₀₁₋₁₅₄ +	lpf ₀₁₋₁₄₁ */ lpf ₀₁₋₁₁₃ *	lpf ₀₁₋₁₅₄ */ lpf ₀₁₋₁₁₃ *	lpf ₀₁₋₁₄₁ ⁺ /lpf ₀₁₋₁₅₄ ⁺ lpf ₀₁₋₁₁₃ ⁺
Α	11 (4.7)	11 (4.7)	11 (4.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	11 (4.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
В	12 (5.1)	0 (0) ^α	9 (3.8)	1 (0.4)	0 (0)	9 (3.8)	1 (0.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
С	73 (30.9)	1 (0.4) ^a	6 (2.5) ^a	64 (27.1) ^α	0 (0)	0 (0)	58 (24.6)	0 (0)	0 (0)	5 (2.1)	1 (0.4)
D	50 (21.2)	$1(0.4)^{\alpha}$	$1(0.4)^{\alpha}$	$26(11)^{\beta}$	0 (0)	0 (0)	26(11)	1 (0.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Е	90 (38.1)	2 (0.8) ^{<i>a</i>}	3 (1.3) ^a	52 (22) ^α	0 (0)	0 (0)	50 (21.2)	1 (0.4)	0 (0)	1 (0.4)	1 (0.4)
TOTAL	236 (100)	15 (6.4)	30 (12.7)	143 (60.6)	0 (0)	9 (3.8)	135 (57.2)	13 (5.5)	0 (0)	6 (2.5)	2 (0.8)

Supplemental Figure 1. The presence of lpf_{OI-141} , lpf_{OI-154} and lpf_{OI-113} operons was determined by PCR in 236 STEC/EHEC isolates and allocated according to the strain source (**A**) and seropathotype (**B**). Results are expressed as total number of lpf-positive strains and as percentages of total strains (in bracket). Prevalence of each lpf operon in the seropathotype A was compared to that in other seropathotypes and statistical differences were indicated by α (p < 0.01) or β (p < 0.001). Prevalence of lpf genes was determined and expressed as percentages of the total number of strains in each seropathotype.



0157:H7-∆ lpfA_{0I-141}

0157:H7- *∆* lpfA_{0ŀ141}/ *∆* lpfA_{0ŀ154}

С

O157:H7

0157:H7-∆lpfA_{0I-154}



D Stx concentration Strains Cytotoxic titer (ng/mL) WT O157:H7 strain EDL933 1/256 8.2 ± 1.8 ng/ml O157:H7-∆stx2 0157:H7-*ДlpfA*01-141 1/256 8.2 ± 1.8 ng/ml O157:H7-*∆lpfA_{0I-141}* + pBAD24-*lpfA_{0I-141}* 1/256 8.2 ± 1.8 ng/ml 0157:H7-*ДlpfA*01-154 1/256 8.2 ± 1.8 ng/ml O157:H7-*AlpfA*₀₁₋₁₅₄ + pBAD33-*lpfA*₀₁₋₁₅₄ 1/256 $8.2\pm1.8~\text{ng/ml}$ 0157:H7-*ΔlpfA*01-141/*ΔlpfA*01-154 1/256 8.2 ± 1.8 ng/ml O157:H7- $\Delta lpfA_{Ol-141}/\Delta lpfA_{Ol-154}$ + pBAD24- $lpfA_{Ol-141}$ + pBAD33- $lpfA_{Ol-154}$ 1/256 8.2 ± 1.8 ng/ml O6:H10 strain NV110 1/256 8.2 ± 1.8 ng/ml



Supplemental Figure 2. Bacterial growth, mobility, cytotoxicity and EHEC EDL933 adhesion to intestinal epithelial cells are not influenced by *lfp* deletion. (A) Growth kinetic in LB broth of wild-type EHEC O157:H7 EDL933, *lpf* isogenic mutants, trans-complemented

and O6:H10 NV110 strains was analyzed by measurement of optical density at 620 nm. Results are expressed as means \pm standard deviations (n = 3). (B) Bacterial mobility was assessed on 0.3% LB agar plates (24 h, 37°C) by visualization of halo radial diffusion around the primary inoculum. O157:H7 EDL933- $\Delta fliC$ was used as a negative control. Results are expressed as means \pm standard deviations (n = 3). (C) Transmission electron micrographs of negatively stained wild-type O157:H7 strain EDL933 and $\Delta lpfA_{OI-141}$, $\Delta lpfA_{OI-154}$ and $\Delta lpfA_{OI-154}$ $_{141}$ / $\Delta lpfA_{OI-154}$ isogenic mutants at × 15,000 magnification (scale bars = 0.5 µm). (D) Quantification of Stx production using a Vero toxin assay. Results are expressed as the reciprocal of the highest sample dilution causing 50% cell detachment after 24 h incubation and as the corresponding Stx concentration in $ng/ml \pm standard$ deviations (n = 3). No cytotoxic effect (-). (E) Caco-2 cells were infected at MOI 100 with EHEC bacteria (wildtype EHEC O157:H7 strain EDL933, lpf isogenic mutants, trans-complemented strains and O6:H10 strain NV110) after a 3 h growth in DMEM supplemented with 2% bile salts. E. coli C600 and AIEC LF82 were used as negative and positive controls, respectively. The number of adherent bacteria was determined by plating 3 h after infection. Results are given as mean percentages of infective dose \pm standard deviations (n = 4). Statistically different from EDL933 wild-type strain at p < 0.001 (***).

Primer name	Oligonucleotide sequence (5' to 3')	Use	Reference
Prevalence o	of $lpfA_{0L,U}$, $lpfA_{0L,U}$ and $lpfA_{0L,U}$ in the strains collection	I	
lpfO141-F	CTGCGCATTGCCGTAAC	Prevalence analysis of <i>lnfA</i>	
lpfO141-R	ATTTACAGGCGAGATCGTG	141	71
0154-FCT	GCAGGTCACCTACAGGCGGC	Prevalence analysis of <i>lpfA</i> or	~
O154-RCT	CTGCGAGTCGGCGTTAGCTG	154	/1
lpfA-F	ATGAAGCGTAATATTATAG	Prevalence analysis of <i>lpfA</i> _{ot}	71
lpfA-R	TTATTTCTTATATTCGAC	113	/1
Construction	n of <i>lpf</i> isogenic mutants and transcomplemented strains		
K1	CAGTCATAGCCGAATACCCT		
K2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	Kanamycin resistance cassette	71
Kt	CGGCCACAGTCGATGAATCC	amplification	
	<i>∆lpfA</i> ISOGENIC MUTANT		•
MilpfA1-1	ТGGA	EDL933-AlpfA	
	AGTTGTCGATTTTAATACATCAAGATTTTCTTTTTAATGTAATTTTTTAACATATGAA	isogenic mutant construction	This study
MilpfA1-2	TATCC	isogenie mutant construction	
lpf A1-1	CGTTGCCAGAGTAGAAACGT	т.,,,	TT1 · / 1
lpf A1-2	GAGCTTTAGTGGTGTTGGTG	Isogenic mutant verification	This study
lpf A1-3	CTGCCATCATAAATTACGCGA	Isogonia mutant varification	This study
lpf A1-4	GCTATTAATATATTATTCGTATAATT	Isogenic initiant vermeation	This study
NcoI-LpfA1	ATTATTCCATGGAGTTTTTCATGAAAAACGTCG	Transcomplementation	This study
PstI-LpfA1	ATTATTCTGCAGTTACTCGTAAGACAGGTTGAAATC	construction	This study
	AlpfA ISOGENIC MUTANT		
M:1-640 1	AACCATAATGGCGAGCGCCATTTTATTTAAGGTATTATGTTAAGAATGATGTAGGCT		
MilpIA2-1	GGAGCT	EDL933-AlpfA _{OI-154}	This study
MilnfA2-2	AATAAATGGATAACACACAGGAATAATATCAAATTAATGGAGTTATATTTCATATG	isogenic mutant construction	This study
Minph 12 2	AATATCC		
lpf A2-1	CGAGCCATGAACTTCATGGA	Isogenic mutant verification	This study
lpf A2-2	CIGGATAACICIAACGATGCI		,
lpf A2-3	GTAGCCATCGACATCTGCG	Isogenic mutant verification	This study
Ipt A2-4			-
Xbai-LpiA2	AATAATICTAGAAGGAGGAATICACCATGAAAACCAAATATGATIGTAGGAGC	Transcomplementation	This study
LpfA2	ATTATTGCATGCTTATTTTATATATTCAACTGTAAACTGCGAG	construction	This study
<i>fim</i> promote	r region polymorphisms		
Primer A	CTCAAGCATAAAAATTTTAAAAAACGA	Determination of the 16 bp	
Primer B	TAACCTACCCAGGTTCAGGGACGT	deletion	71
Primer C	CTCAAGCATAAAAATTTTAAACTAACTG	in the <i>fim</i> promoter	
Survival kin	etic of EHEC in the ARCOL model	•	•
VT1c	ACCCTGTAACGAAGTTTGCG		70
VT1d	ATCTCATGCGACTACTTGAC	Target gene: Shiga-toxine 1	12
Expression of	of <i>lpfA</i> and <i>lpfA</i> a		
рт	01-141 01-134 01-115		
InfO154-F	TATGGCAGGTCACCTACAGG	Expression analysis of <i>lpfA</i>	
RT_			This study
lpfO154-R	AGGTTTCCGGGCATTGAGTC	154	
LPFA1-CF	GGTTGGTGACAAATCCCCG	Expression analysis of <i>lpfA</i>	
LPFA1-CR1	CGTCTGGCCTTTACTCAGA	141	/2
Eco1457F	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC	Housekeeping gene	
Eco1652R	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	Enterobacteriaceae 16S	/3

Supplemental Table 1. Primers Used for PCR, qPCR and RT-qPCR Analyses.

	In vitro	models				
	TIM-1 (gastric and small intestinal model)	ARCOL (large intestinal model)				
	Body temperature (37°C)					
	Gastric pH from 6 to 1.7 Duoddenal pH 6.4 Jejunal pH 6.9 Ileal pH 7.2	Colonic pH 6.3				
	Chyme mixing	Redox potential (-400 mV)				
Main parameters	Transits time	Retention time (36h)				
	Gastric, biliary and pancreatic secretions	Supply of ileal effluents				
	Passive absorption of water and digestion products	Passive absorption of water and fermentation metabolites				
	No microbiota	Anaerobiosis maintained by resident microbiota activity				

Supplemental Table 2. Main parameters of the *in vitro* models TIM-1 and ARCOL

COMMENTAIRES DE LA PUBLICATION N°3

Des études précédentes réalisées au laboratoire ont permis de montrer que les EHEC transloquent préférentiellement au niveau des cellules M à la surface des plaques de Peyer (Etienne-Mesmin et *al.*, 2011). Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans ce ciblage restent mal connus. Par analogie avec *Salmonella* et les AIEC, nous nous sommes intéressés à des adhésines fimbriales, les Lpf. L'analyse du génome de la souche EHEC de référence EDL 933 a mis en évidence deux opérons *lpf* insérés dans les îlots (ou O Islands), OI141 et OI154. (Perna et *al.*, 2001). Un autre opéron (*lpf*₀₁₁₃) a également été décrit chez des souches de sérotype O113:H21 ne possédant pas le gène *eae*; il est inséré dans la région chromosomique correspondant à l'OI-154. Un quatrième opéron (*lpf*₀₂₆) a été décrit chez des souches STEC de sérogroupe O26 (Doughty et *al.*, 2002; Toma et *al.*, 2004).

L'objectif de notre étude était (i) de déterminer la prévalence des opérons *lpf* au sein d'une collection de souches STEC, (ii) de suivre la survie et l'expression des *lpf* lors du transit de la souche de référence *E. coli* O157:H7 EDL933 dans l'ensemble du tractus digestif humain et (iii) d'évaluer le rôle des Lpf dans le ciblage des EHEC aux plaques de Peyer en utilisant des approches *in vitro* et *in vivo* complémentaires.

L'expression des gènes *lpf* d'EDL933 a été déterminée dans le tractus digestif supérieur et dans l'environnement colique humain en utilisant des modèles *in vitro* dynamiques mimant le tube digestif de l'homme (TIM 1 et ARCOL). La capacité de la souche sauvage EDL933 et des mutants *lpf* à transloquer au travers d'une monocouche de cellules M a été évaluée dans un modèle *in vitro* de culture de cellules M. Enfin, nous avons étudié l'implication des Lpf dans l'interaction du pathogène les plaques de Peyer dans un modèle *in vivo* d'anses iléales murines.

Prévalence des opérons lpf chez les EHEC selon leur séropathotype

La prévalence des trois opérons les plus fréquents chez les EHEC - lpf_{OI-141} , lpf_{OI-154} et lpf_{OI-113} – a été évaluée parmi une collection de souches STEC/EHEC O157 et non O157 isolées chez l'homme, chez les bovins, et dans les aliments (Pradel et *al.*, 2000). Les souches STEC peuvent être classées en cinq séropathotype (A à E), en fonction de leur degré d'association aux

épidémies et de la fréquence des cas de SHU. Le séropathotype A correspond aux souches de sérotype O157:H7, les plus fréquemment associées aux épidémies et aux SHU. Le séropathotype B inclut des souches moins fréquemment associées aux épidémies (comme par exemple les sérotypes O26:H11 ou O103:H2). Le seropathotype C correspond aux sérotypes associés à des cas de SHU sporadiques mais pas à des épidémies (par exemple O113:H21). Les souches du séropathotype D ont été associées à des cas de diarrhée, mais pas à des épidémies ou des cas de SHU; enfin, le séopathotype E correspond à des sérotypes qui n'ont jamais été isolés d'infection chez l'homme (Karmali et *al.*, 2003).

Nos résultats montrent que les opérons lpf_{Ol-141} et lpf_{Ol-154} sont associés au séropathotype A. Toma et *al.* (2004) ont montré qu'en plus des Lpf_{Ol-141} et Lpf_{Ol-154}, ces souches étaient systématiquement associées aux adhésines **intimine** (codée par le gène *eae* responsable des lésions d'attachement/effacement), **Iha, EfaI** et **ToxB**. Pour les auteurs, ceci indique que les Lpf ne sont pas les adhésines majeures des EHEC. L'opéron lpf_{Ol-113} est quant à lui fréquemment retrouvé dans les souches de séropathotypes C à E, considérées comme moins pathogènes chez l'Homme, ce qui est en accord avec les données de la littérature (Toma et *al.*, 2004). Pourtant, cet opéron a été identifié par hybridation soustractive entre les souches O91:H21 (isolée d'un SHU) et O6:H10 (isolé de bovins), dans une étude ayant pour objectif de déterminer les facteurs impliqués dans la virulence (Pradel et *al.*, 2002). L'ensemble de ces résultats montre une association de certains variants Lpf avec les souches les plus pathogènes chez l'homme, et suggère un rôle des Lpf dans la pathogénicité des souches EHEC O157:H7, même si ce rôle n'est pas clairement défini. En effet, les Lpf étant aussi présents chez des *E. coli* non pathogènes (Toma et *al.*, 2006), ils ne peuvent pas être utilisés seul comme marqueur de virulence.

Expression des gènes *lpfAoi-141* et *lpfAoi-154* et survie de la souche EHEC O157:H7 EDL933 dans l'environnement digestif simulé

À ce jour, l'expression dans l'environnement digestif des gènes *lpf* des EHEC, mais aussi d'autres pathogènes tels que *Salmonella* et les EPEC (*E. coli* entéropathogènes), n'avait été évaluée que dans des approches *in vitro* simplifiées où un seul paramètre à la fois était pris en compte, comme la valeur du pH ou la présence de sels biliaires (Torres et *al.*, 2007 ; Chassaing et *al.*, 2013 ; Arenas-Hernández et *al.*, 2014 ; Hu et *al.*, 2015 ; Kingsley et *al.*,

2002 ; Low et *al.*, 2006 ; Hu et *al.*, 2015). Nous avons suivi, dans des modèles artificiels simulant de la façon la plus physiologique possible les conditions rencontrées dans la lumière gastro-intestinale du tractus digestif supérieur et du colon humains, l'expression des sous-unités majeures A des Lpf des deux opérons (OI₁₄₁ et OI₁₅₄) décrits chez O157:H7 EDL933. Nous avons montré que les gènes *lpf* sont surexprimés dans l'environnement gastrique et intestinal de l'Homme, mais aucune surexpression n'a été mesurée dans l'environnement colique. Il est à noter qu'un seul opéron, *lpf*_{OI-141}, a pu être suivi au niveau colique, car il n'a pas été possible de développer des amorces spécifiques à *lpf*_{OI-154} dans l'écosystème microbien complexe du colon. Nos résultats indiquent que, même en l'absence de contact avec des cellules hôtes, l'environnement digestif peut suffire à induire l'expression d'adhésines bactériennes. Il pourrait être intéressant de développer des souches possédant des gènes rapporteurs sous la dépendance des promoteurs *lpf* et d'étudier leur comportement en modèle murin, afin de confirmer in vivo, dans les différents compartiments, les données obtenues dans l'environnement digestif simulé.

Dans les effluents gastriques, les gènes lpf_{OI-141} et lpf_{OI-154} sont significativement surexprimés dès les premières minutes de digestion, alors qu'aucune induction n'est observée pour d'autres gènes comme stx1 et stx2. Jusqu'à présent, aucune étude n'avait décrit l'influence de l'ensemble des paramètres physico-chimiques rencontrés dans l'estomac, et principalement le pH acide, sur l'expression des gènes lpf. De façon inattendue, une augmentation d'un facteur 15 de l'expression des deux opérons lpf a été observée. L'intérêt de la production de fimbriae par les EHEC au niveau gastrique est difficile à expliquer dans l'état actuel de nos connaissances. L'expression des lpf est sous contrôle de la protéine H-NS qui agit comme un répresseur et de la protéine Ler qui lorsqu'elle est présente, lève la répression induite par H-NS et active ainsi les gènes cibles. Une étude transcriptomique in vitro a montré qu'une exposition à un pH acide entrainait une surexpresion du gène ler chez O157:H7 (House et al., 2009). H-NS est un facteur de transcription global et aucune étude n'a clairement établi l'influence du pH sur sa régulation. Afin de mieux comprendre la régulation de l'expression des gènes *lpf*, il serait intéressant de suivre l'expression de ces facteurs dans notre modèle. De plus, d'autres facteurs de transcription, encore indéfinis à l'heure actuelle, pourraient induire l'expression des lpf dans les conditions gastriques. L'étude des régions promotrices des opérons lpf chez les souches EHEC pourrait permettre d'identifier l'ensemble des facteurs impliqués dans ces mécanismes de régulation.

Au niveau iléal, notre étude montre pour la première fois dans un modèle dynamique proche des conditions physiologiques, que les gènes lpf_{OI-141} et lpf_{OI-154} sont surexprimés parallèlement à la reprise de croissance des souches EHEC. Nos résultats indiquent donc que les EHEC sont présents en grand nombre et produisent les Lpf au niveau de l'iléon terminal, zone où la majorité des Plaques de Peyer est localisée. Les sels biliaires et un pH neutre, caractéristiques du compartiment iléal, ont été décrit comme des facteurs activateurs de l'expression des lpf chez les AIEC (Chassaing et al., 2013) mais aussi chez les EHEC 0157:H7 (Torres et al., 2007 ; Arenas-Hernández et al., 2014). Nous avons confirmé, en milieu synthétique, que la présence de sels biliaires induisait une augmentation de l'expression des opérons lpf plus forte pour l'opéron OI154. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Arenas-Hernández et al. (2014) qui ont montré que l'expression de lpf_{Ol-154} est induite à pH neutre, à 37°C et en présence de sels biliaires. Chassaing et al., (2013) ont analysé les séquences nucléotidiques en amont de l'opéron lpf chez 6 souches AIEC et ont mis en évidence des séquences consensus où se fixent des facteurs de transcription activés par les sels biliaires : CytR, FhIA, NhaR et PdhR. Chez O157:H7, Arenas-Hernández et al. (2014) ont identifié quatre séquences consensus en amont de l'opéron *lpf*_{OI-154} où pouvait se lier la protéine Fur, un facteur de transcription impliqué dans l'assimilation du Fer et qui agirait comme répresseur de l'expression du gène lpf_{OI-154}. L'étude complète des régions promotrices des opérons lpf chez la souche EHEC O157:H7 pourrait permettre la mise en évidence de l'ensemble des facteurs de transcription impliqués dans cette régulation par les sels biliaires.

Les résultats que nous avons obtenus et les données de la littérature indiquent que l'environnement de l'intestin grêle est favorable à l'expression des *lpf*. En effet, les acides biliaires sont soumis à la circulation entéro-hépatique, qui les libère au niveau du duodénum et les réabsorbe au niveau de l'iléon distal, expliquant la faible concentration en acides biliaires observée au niveau colique (Hofmann, 1999). Même si le colon a longtemps été considéré comme site d'action principal des EHEC, nos résultats indiquent que la croissance bactérienne peut être maximale au niveau iléal et que l'expression de certains facteurs de virulence, comme les Lpf, peut être fortement augmentée dans l'intestin grêle.

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

Les travaux réalisés au laboratoire ont montré, en modèle *in vitro* de cellules M, que la souche EHEC sauvage EDL933 transloquait préférentiellement au niveau de ces cellules, comparativement aux cellules épithéliales intestinales Caco-2.

Une étude récente réalisée au Japon avait permis de montrer que la glycoprotéine GP2, spécifiquement exprimée à la surface des cellules M présentes dans le FAE, permettait la liaison d'entérobactéries commensales et pathogènes, telles que *Salmonella enterica* serovar Typhimurium et *Escherichia coli* (Hase et *al.*, 2009). Ce mécanisme d'interaction avec les cellules M, ainsi que la mise en place de la réponse immunitaire qui en découle, implique l'adhésine FimH, localisée à l'extrémité des pili de type 1 bactériens. Nous avons utilisé la technique décrite par Shaikh et *al.* (2007) afin de vérifier l'absence de pili de type I à la surface de la souche O157:H7 EDL933 utilisée dans nos travaux. L'interaction des EHEC avec les plaques de Peyer passerait donc par un mécanisme autre que la reconnaissance de la protéine GP2 par les pili de type I bactériens.

Afin de démontrer l'implication des LPF dans le tropisme des EHEC pour les plaques de Peyer, nous avons généré des mutants des deux opérons *lpf* présents chez la souche O157:H7 EDL933, et vérifié que ces mutations n'avaient pas d'influence sur la survie, la mobilité et la production de Shiga-toxines. Des analyses complémentaires de microscopie électronique à transmission n'ont pas permis de visualiser les Lpf à la surface des bactéries O157:H7 EDL933. L'utilisation d'un anticorps anti-Lpf pourrait éventuellement permettre d'observer ces structures filamenteuses ; cependant, cette stratégie n'a pas permis la visualisation des Lpf chez les AIEC (Chassaing et *al.*, 2013) et de façon peu convaincante chez des souches O157:H7 (Torres et al., 2007), certainement à cause d'un manque de spécificité de l'anticorps.

Dans nos travaux, la capacité des bactéries à adhérer aux cellules épithéliales n'est pas altérée chez les mutants lpf. L'analyse de la littérature montre des résultats contradictoires : la mutation des gènes lpf_{OI-141} et lpf_{OI-154} diminue la capacité d'adhésion de la souche O157:H7 aux cellules épithéliales in vitro (Torres et *al.*, 2002 ; Fitzhenry et *al.*, 2006b ; Farfan et *al.*, 2011) ainsi que dans des modèles de culture d'organes *in vitro* (Lloyd et *al.*, 2012). Au

contraire, le double mutant *lpf* adhère à des niveaux plus élevés que celui de la souche sauvage en modèle de culture cellulaire T84 (Lloyd et *al.*, 2012). Chez les EPEC ou *Citrobacter rodentium* les Lpf ne sont pas impliqués dans l'adhésion aux différentes cellules épithéliales Caco2, T84 et Hela (Newton et *al.*, 2004 ; Tatsuno et *al.*, 2006). En modèles animaux, des études chez le mouton ou le cochon ont suggéré que les LPF pourraient être impliqués dans la colonisation, les mutants délétés des gènes *lpf* étant retrouvés à des niveaux plus faibles dans les fèces. Cependant, le simple mutant *lpf_{Ol-141}* n'est pas affecté dans sa capacité à coloniser un modèle animal (Jordan et *al.*, 2004). De plus, dans un modèle *in vivo* chez le lapin, aucune différence dans la colonisation n'a été observée entre la souche sauvage EPEC et les mutants *lpf* (Newton et *al.*, 2004). Les résultats divergents concernant le rôle des opérons *lpf* dans l'adhésion à différentes lignées cellulaires, et dans la colonisation de différents modèles animaux pourraient être dus à des mécanismes subtils de régulation de ces opérons, dépendant des conditions testées, ou encore à des phénomènes de régulation croisée avec d'autres adhésines. Une autre hypothèse pourrait être que ces fimbriae sont spécifiquement voués au ciblage des cellules M.

Nous avons observé une diminution significative de la translocation au niveau des cellules M pour les mutants isogéniques délétés des gènes *lpf* ainsi qu'une diminution des interactions avec les plaques de Peyer au niveau de l'iléon. Par contre, les LPF ne jouent aucun rôle dans les interactions des EHEC avec la muqueuse iléale dépourvue de plaques de Peyer. Nos résultats indiquent que ces fimbriae sont essentiels à l'interaction des EHEC avec les plaques de Peyer murines *in vivo* et corroborent ceux obtenus chez d'autres entérobactéries, les *Salmonella* et les AIEC, qui indiquaient que les Lpf sont impliqués dans le tropisme de ces pathogènes pour les plaques de Peyer (Bäumler et *al.*, 1996 ; Chassaing et *al.*, 2011). Par contre, des études en modèle *in vitro* de culture d'intestin humain (IVOC) avaient montré que la mutation des gènes *lpf* perturbait le tropisme spécifique des EHEC pour le FAE : en effet, les mutants adhéraient à des niveaux plus élevés non seulement au FAE, mais aussi à la muqueuse intestinale comparativement à la souche sauvage (Fitzhenry et *al.*, 2006).

Nos résultats indiquent que le double mutant délété des deux opérons *lpf* puis transcomplémenté interagit à des niveaux significativement plus élevés que la souche sauvage (avec un IC = 2,6). Ceci pourrait être dû à une surexpression de Lpf secondaire à la complémentation en trans, ou à la dérégulation d'autres facteurs de colonisation. L'analyse de la littérature révèle des résultats paradoxaux dans plusieurs études. En effet, un double mutant

lpf d'une souche O157:H7 colonise à des niveaux supérieurs à ceux de la souche sauvage en modèle IVOC chez l'agneau et chez l'homme (Fitzhenry et *al.*, 2006 ;Torres et *al.*, 2007). De même, en modèle de culture cellulaire T84, le double mutant *lpf* adhère à des niveaux plus élevés que celui de la souche sauvage (Lloyd et *al.*, 2012). Les auteurs ont montré que la délétion des gènes *lpf* entraînait une surexpression d'un facteur d'adhésion, les curli, à la surface des bactéries, ce qui expliquerait la plus grande capacité d'adhésion du mutant aux cellules épithéliales. Nous n'avons pas observé ce phénomène chez les mutants isogéniques que nous avons construits, puisque la délétion des gènes *lpf* n'a pas influencé la mobilité des bactéries, ni les capacités d'adhésion aux cellules épithéliales, ni d'ailleurs la synthèse de toxines.

Pathogénicité de la souche O6:H10 et interactions avec les Plaques de Peyer

Les souches O6:H10 productrices de Shiga-toxines sont très largement retrouvées dans l'environnement digestif du bovin mais ne sont pas impliquées dans des infections humaines. Afin de vérifier si l'absence de pathogénicité était liée à une moindre capacité de survie et/ou de multiplication dans le tractus digestif de l'homme, nous avons voulu déterminer la survie d'une souche O6:H10 dans les conditions digestives humaines. Aucune différence n'a pu être observée avec la souche O157:H7 : la souche O6:H10 testée est résistante aux conditions gastriques et une multiplication bactérienne est retrouvée dans les parties distales dans l'intestin grêle (données non présentées). Grâce à une technique d'hybridation soustractive, nous avions montré que la souche O6:H10 était naturellement déficiente pour les gènes *lpf* (Pradel et *al.*, 2002) : ceci pourrait en partie expliquer son absence de pathogénicité chez l'Homme. Alors qu'aucune différence n'est observée dans l'adhésion aux cellules épithéliales, comparativement à la souche O157:H7, la souche O6:H10 testée n'est pas capable de transloquer au travers des cellules M ni d'interagir avec des plaques de Peyer dans un modèle *in vivo* d'anses iléales.

L'ensemble de ces résultats permet d'affirmer le rôle pathogène des Lpf et leur implication spécifique dans le tropisme des EHEC O157:H7 pour les plaques de Peyer.

CHAPITRE 4 :

SURVIE ET VIRULENCE DES EHEC DANS L'ENVIRONNEMENT DIGESTIF SIMULÉ DE L'ENFANT

Introduction à la publication n°4

Les EHEC sont responsables de toxi-infections alimentaires, pouvant évoluer vers des atteintes systémiques comme le syndrome hémolytique et urémique (SHU) mettant en jeu le pronostic vital. Les infections causées par les EHEC constituent une préoccupation importante de santé publique en raison de la sévérité des symptômes qu'elles peuvent générer. Les populations ayant une probabilité plus forte que la moyenne de développer des symptômes ou des formes graves de la maladie sont les enfants de moins de 15 ans (surtout en dessous de 3 ans) et les personnes âgées. Le syndrome hémolytique et urémique est en effet la principale cause d'insuffisance rénale chez l'enfant de moins de 3 ans et plus d'un tiers des malades conservent des séquelles rénales à long terme (Bruyand et *al.*, 2015). La survie des EHEC et la régulation des gènes de virulence dans l'environnement digestif humain sont des facteurs importants dans la physiopathologie de ces infections mais restent encore mal connus, essentiellement par manque de modèles d'études adaptés, en particulier reproduisant les conditions spécifiques propres à l'« enfant ».

Actuellement, le système digestif artificiel TIM 1 (Minekus et *al.*, 1995) est le modèle multi-compartimenté dynamique simulant de la façon la plus physiologique possible les conditions rencontrées dans la lumière gastro-intestinale du tractus digestif supérieur de l'Homme. Des études antérieures au laboratoire utilisant le modèle TIM 1 ont montré une

mortalité d'*E. coli* O157:H7 dans l'estomac et le duodénum alors qu'une croissance est observée dans les parties distales de l'intestin (Etienne-Mesmin, Livrelli et *al.*, 2011). Néanmoins, cette étude a été réalisée uniquement dans des conditions digestives adultes. De plus, aucune donnée sur l'expression des facteurs de virulence du pathogène au cours de son transit dans le tractus gastro-intestinal humain ne sont disponible.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était (i) d'adapter le modèle TIM 1 afin de simuler les conditions digestives de l'enfant, (ii) d'évaluer la survie et (iii) la virulence des EHEC dans les deux conditions digestives « adulte » et « enfant » et de comparer les résultats obtenus afin d'essayer de mieux comprendre la susceptibilité des enfants aux infections à EHEC.

PUBLICATION N°4

Increased EHEC survival and virulence gene expression indicate an enhanced pathogenicity upon simulated pediatric gastrointestinal conditions

2016 – Pediatric Research – (Impact factor₂₀₁₅: 2.761)

Charlène ROUSSEL^{*}, <u>Charlotte CORDONNIER</u>^{*}, Wessam GALIA, Olivier Le GOFF, Jonathan THÉVENOT, Sandrine CHALANCON, Monique ALRIC, Delphine THEVENOT-SERGENTET, Françoise LERICHE, Tom VAN DE WIELE, Valérie LIVRELLI et Stéphanie BLANQUET-DIOT

*co-premier auteurs

Increased EHEC survival and virulence gene expression indicate an enhanced pathogenicity upon simulated pediatric gastrointestinal conditions

Charlène Roussel^{1,2}, Charlotte Cordonnier^{1,3}, Wessam Galia^{1,4,5}, Olivier Le Goff¹, Jonathan Thévenot^{1,3}, Sandrine Chalancon¹, Monique Alric¹, Delphine Thevenot-Sergentet^{4,6}, Francoise Leriche⁵, Tom Van de Wiele², Valérie Livrelli^{3,7} and Stéphanie Blanquet-Diot¹

BACKGROUND: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are major foodborne pathogens that constitute a serious public health threat, mainly in young children. Shiga toxins (Stx) are the main virulence determinants of EHEC pathogenesis but adhesins like intimin (eae) and Long polar fimbriae (Lpf) also contribute to infection. The TNO GastroIntestinal Model (TIM) was used for a comparative study of EHEC 0157:H7 survival and virulence under adult and child digestive conditions.

METHODS: Survival kinetics in the *in vitro* digestive tract were determined by plating while bacterial viability was assessed by flow cytometry analysis. Expression of *stx, eae,* and *lpf* genes was followed by reverse transcriptase-quantitative PCR (RT-qPCR) and Stx production was measured by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

RESULTS: Upon gastrointestinal passage, a higher amount of viable cells was found in the simulated ileal effluents of children compared to that of adults (with 34 and 6% of viable cells, respectively). Expression levels of virulence genes were up to 125-fold higher in children. Stx was detected only in child ileal effluents.

CONCLUSION: Differences in digestive physicochemical parameters may partially explain why children are more susceptible to EHEC infection than adults. Such data are essential for a full understanding of EHEC pathogenesis and would help in designing novel therapeutic approaches.

Interohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), mainly from the serotype O157:H7, are food and waterborne pathogens that constitute a serious public health concern. EHEC are responsible for hemorrhagic colitis and bloody diarrhea that can evolve toward life-threatening age-dependent complications (1). The hemolytic uremic syndrome (HUS), defined by the triad of acute renal failure, thrombocytopenia, and microangiopathic hemolytic anemia, mainly affects young children under 3 y of age (1–3) while thrombotic thrombocytopenic purpura, characterized by central nervous system damages, more commonly afflicts adults and elderly. In Europe and France, EHEC infections are the leading cause of renal failure in children. Even if Shiga toxins (Stx) are the main virulence determinants of EHEC, other factors such as intimin (eae) and adhesins (including Long polar Fimbriae (Lpf)) also contribute to human pathogenesis by mediating bacterial colonization (4,5).

Survival and virulence of EHEC strains in the human gastrointestinal (GI) tract are key factors in the infectious process (6) but they remain poorly described, mainly in children, due to a lack of relevant models. Studies in humans are obviously prohibited and results obtained in animal models are hampered by differences between animal and human digestive physiology. In vitro digestion methods emerge as an appropriate alternative to in vivo assays providing that such models can reproduce physiologically relevant conditions. Among the available systems, the dynamic multicompartmental and computer-controlled TNO gastrointestinal model (TIM) is currently the most complete simulator of the upper GI tract (7) and has been validated for microbial applications against in vivo data (8). Previous works in this model have assessed the survival of E. coli O157:H7 when ingested within a food matrix (9,10), but experiments were carried out only under adult conditions and no data are available on virulence gene expression during GI transit.

In this context, the aim of this study was to use the TIM model for a comparative analysis of *E. coli* O157:H7 survival and virulence under adults and young children (from 6 mo to 2 y)

Received 18 March 2016; accepted 15 May 2016; advance online publication 17 August 2016. doi:10.1038/pr.2016.144

The first two authors contributed equally to this work.

¹EA 4678 CIDAM, Conception Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France; ²CMet, Center for Microbial Ecology and Technology, Ghent University, Ghent, Belgium; ³M2iSH, Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte UMR INSERM/Université d'Auvergne, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France; ⁴UMR 5557 Ecologie Microbienne, Research Group on Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment, CNRS, VetAgro Sup and Université de Lyon, France; ⁵Unité CALYTISS, VetAgro Sup, Lempdes, France; ⁶Laboratoire d'Etude des Microorganismes Alimentaires Pathogènes, French National Reference Laboratory for Escherichia coli including Shiga Toxin-Producing E. coli, VetAgro Sup, Université de Lyon, Marcy l'Etoile, France; ⁷Service de Bactériologie, CHU de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France: Stéphanie Blanquet-Diot (stephanie.blanquet@udamail.fr)

Articles

digestive conditions, upon simulated ingestion of a glass of contaminated water.

RESULTS

Survival and Physiological State of EHEC O157:H7 in the Simulated Stomach

Whatever the simulated age group (adult or child), no significant difference was observed between the survival kinetics obtained for O157:H7 and the transit marker, showing that the growth ability of the pathogen (as assessed by numeration of cultivable cells) was not affected by gastric conditions (**Figure 1a**). In contrast, flow cytometry analysis of gastric effluents showed marked differences in the physiological state of bacteria between adult and child conditions (**Figure 1b**). At 60 min digestion, a higher percentage of viable cells was observed under child conditions compared with adult ones (59.0 vs. 21.9%), together with a lower number of damaged cells (18.0 vs. 46.2%), whereas similar initial viability profiles were observed between adult and child conditions. Our results indicate that cells that are likely to reach the small intestine would be less damaged in infants compared with adults.

Survival and Physiological State of EHEC O157:H7 in the Simulated Small Intestine

In the duodenal simulated compartment, EHEC survival was unaffected in both age conditions. In contrast, bacterial mortality was noticed halfway the jejunum- and ileum-simulated digestion time, but only under adult conditions (Figure 2a). In adults, bacterial recovery percentages after 120 min were $2.8 \pm 0.4\%$ (*n* = 4) vs. 27.5% for the transit marker (*P* < 0.01) in the jejunum and $11.4 \pm 5.5\%$ (*n* = 4) vs. 37.9% in the ileum (P < 0.001). At the end of digestion (240–360 min), the trend reversed with the recoveries of bacteria exceeding those of the transit marker, thus indicating bacterial outgrowth. EHEC growth was much more pronounced under simulated child conditions with differences between bacteria and transit marker being significant both in the jejunal and ileal compartments (P < 0.05). At 360 min during the child assays, a survival percentage of $87.3 \pm 30.7\%$ (*n* = 4) was found for O157:H7 compared with 2.2% for the marker (P < 0.001) in the jejunum and $441.7 \pm 341.2\%$ (*n* = 4) compared with 13.5% in the ileum (P = 0.063). Results based on flow cytometry analysis of ileal effluents (Figure 2b) strengthened those obtained by cultivation. The percentages of damaged cells remained constant around 15% throughout child digestions while they regularly increased during adult experiments (from 5.4% at t0 to 37.9% at 300 min). Conversely, the percentages of viable cells dramatically decreased during adult digestion (from 77.1% at t0 to 6.3% at 300 min) whereas they decreased then increased in child assays (from 77.1% at t0 to 21.9% at 180 min; and 33.9% at 360 min). This last feature is in accordance with the cell mortality followed by growth observed by cultivation, mainly under child conditions. Our results also indicate that, when entering the colon, most of bacterial cells are viable under child digestive conditions while in adults most of them have a damaged membrane.

Expression of EHEC Virulence Genes in the Simulated GI Tract

Gastric effluents of the simulated child conditions in TIM (Figure 3a) displayed significant up-regulated stx1 and stx2 at 10, 20, 40, and 60 min (with a fold change up to 125 for stx1 and up to 12 for *stx2* compared with t0, P < 0.001). However, stx upregulation was not observed under simulated adult conditions, resulting in significantly higher stx1 and stx2 expression levels upon child gastric conditions compared with adult ones (P < 0.01). In the ileal effluents (Figure 3b), stx1, and stx2 were up-regulated from 60 to 240 min in the child digestions, yet significant upregulation levels were only obtained at 180 min with a fivefold to sevenfold increase (P < 0.05). In adult ileal effluents, *stx* genes were significantly up-regulated in the same order of magnitude, but at 120 and 180 min for stx1 (P < 0.05); and at 60 and 240 min for stx2(P < 0.001). stx expression levels were significantly higher in children compared with adults only at 60 min for stx1 (P < 0.01). Results provided by enzyme-linked immunosorbent assay (Figure 4) fully support the difference obtained between adults and children with RT-qPCR. No Stx was evidenced under adult conditions while toxins were detected in the ileal effluents of children from 60 min and the amount produced regularly increased to reach 0.89 ± 0.12 ng/ml at $300 \min(n = 4)$. Stx concentrations were significantly higher during child digestions compared with the adult ones from $120 \min (P < 0.05).$

In the gastric effluents from children (Figure 5a), eae expression was significantly (P < 0.001) repressed compared with the initial conditions from 10 to 60 min. On the contrary, under adult conditions, eae was over-expressed at 10 and 20 min (P < 0.05) with a fold change up to 15, resulting in significant higher expression levels in adults compared with children from 10 to 40 min (P < 0.01). Notably, at the end of gastric digestion (60 min), the reverse was found with eae mRNA levels higher in children (P < 0.01). In the ileal effluents (Figure 5b), eae mRNA expression levels tended to increase under child conditions from 180 min (P > 0.05), while they were significantly higher than t0 in adults at 60 and 120 min (P <0.001, with up to ninefold change). At the beginning of in vitro digestion (until 120 min), eae was significantly overexpressed in adults compared with children, while the opposite trend was observed at 180 and 240 min (*P* < 0.01).

Lastly, in the gastric effluents (**Figure 6a**), lpf1, and lpf2 were overexpressed compared with t0 under both adult and child conditions, with a fold change up to 12 for lpf1 (P < 0.001, in adults and children) and up to 40 for lpf2 (P < 0.001, in children). lpf1 and lpf2 expression levels were significantly higher in adults at 10 min (P < 0.05), while the reverse was observed at 40 and 60 min with significant higher levels in children (P < 0.05). In the ileal effluents (**Figure 6b**), lpf genes were overexpressed in both age conditions, but higher mRNA levels were found in children with a maximum fold increase of 30 and 60 at 240 min for lpf1 and lpf2, respectively. lpf expression levels were significantly higher under child conditions compared with adult ones, but only at 180 min for lpf1 (P < 0.01).

EHEC pathogenicity and child's gut



Figure 1. Survival and physiological state of EHEC 0157:H7 in the TIM stomach. (**a**) The number of cultivable cells in the gastric compartment was determined by plating. Results are expressed as survival percentages \pm SEM (n = 4) and compared with that obtained with the transit marker (red line). (**b**) Physiological state of 0157:H7 was assessed by live/dead cytometry analysis. Bacteria recovered from gastric effluents were doubled-stained using green-fluorescent SYTO 9 (all cells) and red-fluorescent PI (bacteria with damaged membranes). TIM, TNO gastrointestinal model; EHEC, Enterohemorrhagic *Escherichia coli*.

DISCUSSION

EHEC survival and virulence in the human digestive tract are key features in bacterial pathogenesis (6). Overall, our data suggest that, in comparison with adults, a higher amount of cells, what is more less damaged, may reach the distal parts of the small intestine and the colon in children. Expression of major virulence genes, such as *stx*, is also higher under child digestive conditions.

Up to date, there was only scarce information on the behavior of EHEC strains under human simulated GI conditions (9–11). In addition, none of these studies took into account specific child conditions, despite young children forming a high-risk population for EHEC infection. The aim of this study was to assess and compare the survival and virulence of the reference strain O157:H7 EDL 933 under adult and child digestive conditions by using the well-validated dynamic and multicompartmental TIM model. An exhaustive survey of the

Articles

Articles

Roussel et al.



Figure 2. Survival and physiological state of EHEC O157:H7 in the TIM small intestine. (a) The number of cultivable cells in the small intestinal compartments was determined by plating. Results are expressed as survival percentages \pm SEM (n = 4) and compared with that obtained with the transit marker (red line). O157:H7 significantly different from the transit marker at P < 0.05 (*), P < 0.01 (**), and P < 0.001 (†). (b) Physiological state of O157:H7 was assessed by live/dead cytometry analysis. Bacteria recovered from ileal effluents were doubled-stained using green-fluorescent SYTO 9 (all cells) and red-fluorescent PI (bacteria with damaged membranes). TIM, TNO gastrointestinal model; EHEC, Enterohemorrhagic *Escherichia coli*.

literature was made to identify the physicochemical parameters unique to the child and adult GI tract in a healthy state and subsequently implement them into the TIM program. The survey was restricted to studies involving young children aged between 6 mo and 2 y because (i) children <3 y are a high-risk population for EHEC infection and HUS (3), (ii) the newborns (under 6 mo) mostly have an exclusive milk diet and subsequently show particular digestive physiology (12), and (iii) children >2 y show a mature GI tract, with no difference compared with the adult digestion process. Contaminated water which has been involved in major EHEC outbreaks (13) was chosen as a vehicle for bacteria. A supraphysiological dose of EHEC (10⁷ Colony Forming Unit (CFU)/ml compared with the infectious dose of 10–100 CFU) was used to get enough RNAs in TIM digestive samples for transcriptomic analysis.

EHEC survival kinetics were first established in the TIM model. Our results suggest that O157:H7 is less sensitive to child than adult gastric conditions. This divergence may be explained by differences in stomach pH acidification less rapid and pronounced in children (14,15), associated with gastric

EHEC pathogenicity and child's gut

Articles



Figure 3. Expression of Shiga toxin-encoding genes in the TIM system. *stx 1/2* expression levels were measured by RT-qPCR in the gastric (**a**) and ileal (**b**) effluents of the TIM under child (in gray) and adult (in black) digestive conditions. Results are expressed as means of fold-induction \pm SEM (n = 4). Time points statistically different from t0 at P < 0.05 (†), P < 0.01 (‡), and P < 0.001 (§). Child statistically different from adult at P < 0.01 (**).TIM, TNO gastrointestinal model; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative PCR.



Figure 4. Shiga-toxin production in the ileal effluents of the TIM system. Stx 1/2 were measured in the ileal effluents by ELISA under child (in gray) and adult (in black) digestive conditions. Results are expressed as cumulative amounts in ng/ml \pm SEM (n = 4). Child statistically different from adult at P < 0.05 (*), P < 0.01 (**) and P < 0.001 (†). TIM, TNO gastrointestinal model; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

emptying rates quite similar under both age conditions (16,17). In the small intestinal compartments, a loss of viability was noticed at the middle of digestion in the jejunum and ileum, but only during adult assays. The higher mortality observed in adults might be linked to a twofold higher concentration

Copyright © 2016 International Pediatric Research Foundation, Inc.

in bile salts and pancreatic secretions compared with children (18-24). The bactericidal effect of bile salts toward E. coli strains is well known and attributed to their detergent properties that may lead to the disruption of cell membrane. This phenomenon was maybe enlarged by the fact that in adults, when entering into the small intestine, bacterial cells were more damaged than under child conditions. Conversely, at the end of in vitro digestions, bacterial growth was noticed in the jejunum and ileum under both age conditions, but mainly in children. This growth renewal may be linked to the occurrence of less stringent conditions, such as pH values close to neutrality and lower bile salts concentrations due to their passive reabsorption (as occurs in humans). The higher growth observed during child digestions may be explained by the occurrence of less stressful conditions together with a higher small bowel transit time (25,26), as well as the "better" physiological state of bacteria when entering the small intestine. As terminal ileum and colon are assumed to be the main sites of EHEC pathogenesis (27), this finding may partly explain why young children are a high-risk population for EHEC infection.

The next step was dedicated to the assessment of O157:H7 virulence gene expression in the TIM model. Up to now, regulation of EHEC virulence genes was only investigated in oversimplified *in vitro* approaches integrating a single digestive parameter, such as acidic pH or bile, and never under child conditions. Three genes mainly involved in the virulence of EHEC strains were studied: (i) *stx* encoding Shiga

Articles

Roussel et al.

toxin, known as the main virulence trait of the pathogen and responsible for systemic complications (4), eae encoding intimin, required from intimate attachment to the host intestinal mucosa (5) and, (iii) lpf loci encoding Long Polar Fimbriae, adhesive factors assumed to be involved in key steps of EHEC pathogenesis, such as adhesion, translocation, and inflammation (28).

We showed for the first time that stx genes were upregulated during gastric and small intestinal transit in the TIM system. These results suggest that EHEC O157:H7 would be able to produce its toxins from the stomach in the upper GI tract even if Stx-mediated cytotoxicity is generally associated with distal parts of the small intestine or large intestine (29). Interestingly, we found that expression levels of stx genes and related toxin production were larger under child compared with adult conditions, which is in accordance with the higher sensitivity of young children to EHEC infection and HUS. The large expression levels found in the gastric compartment in children may be related to less acidic conditions, as stx genes were not up-regulated under adult conditions where bacteria have to cope with a higher acidity. This hypothesis was supported by additional assays in the TIM system under "modified child" gastric conditions (child gastric pH curve combined with adult transit time) where stx was still over-expressed (data not shown). Our results are in accordance with those obtained by Yuk and Marshall (30) and Huang et al. (31) who showed a decrease in Stx production in O157:H7 after acid challenge in vitro, but not with those of Yin et al. (32) who observed the opposite trend in acid treated pig ligated intestine. In the small intestine, stx genes were up-regulated both under adult and child conditions. It may be related to the occurrence of neutral pH, but probably not linked to bile salts which do not increase stx expression in LB medium (33,34). Overexpression of stx genes did not result in Stx detection in the ileal effluents of adults, maybe due to concentrations under the detection limit and/or degradation under low gastric pH or by proteases. It is well established that Stx synthesis requires induction of Stx prophages, caused by any stress conditions provoking the SOS response (35). In our study, surprisingly, the high percentages of damaged cells observed under adult conditions in the TIM system were not associated with any detectable toxin, while significant amounts of Stx were measured in children where most of EHEC bacteria were unspoiled. We can then hypothesize that toxin production observed during child digestions may be mostly linked to stx1 overexpression, as it does not necessarily require prophage induction and may also occur under conditions of low iron levels (29).

As for stx, eae, and lpf genes were up-regulated in the gastric and small intestinal compartments of the TIM system. This implies that the expression of EHEC adhesins, such as intimin and Lpf, can be induced even if the pathogen does not come into contact with the host cells. For both adhesins, higher expression levels were found under child conditions compared with adult ones, but only at the end of gastric or GI in vitro digestions. It is worth noting that eae and lpf overexpression occurs in children when most of bacterial cells have reached



а

20

expression levels were measured by RT-gPCR in the gastric (a) and ileal (b) effluents of the TIM under child (in gray) and adult (in black) digestive conditions. Results are expressed as means of fold-induction \pm SEM (n = 4). Time points statistically different from t0 at P < 0.05 (†) and P < 0.001 (§). Child statistically different from adult at P < 0.01 (**). TIM, TNO gastrointestinal model; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative PCR.

60

300

the distal parts of the small intestine. As initial EHEC binding is assumed to occur at the follicle-associated epithelium of Peyer's Patches and villi of terminal ileum or colon (27), these results may suggest a higher ability to colonize in children. Very few studies have investigated the effect of digestive parameters on eae or lpf expression. A significant decrease in eae gene transcripts was observed in vitro when bile salts were added (33,36) and in pig intestinal loops acidified at pH 2.5 (32) while acid challenge (37) and bile salts (32,38) led to an up-regulation of *lpf* genes. Bile salts increase *lpf2* but not *lpf1* in O157:H7 (32), which may explain why lpf2 mRNA levels were higher than lpf1 ones in the small intestine. Current knowledge from literature does not provide any explanation from why *lpf* expression levels were higher under child conditions where a milder acidity and lower bile salt concentrations are found, nor why eae was mainly overexpressed in adults until 120 min digestion when the highest bile concentrations were found in the small intestinal compartments.

To conclude, our study shows that TIM model can provide meaningful insights into the comprehension of EHEC pathogenesis. Taken together, our results indicate that differences in digestive physicochemical parameters related to age conditions may partly explain the highest isolation rate of O157:H7 in the feces of children and their higher sensitivity to EHEC

EHEC pathogenicity and child's gut

Articles



Figure 6. Expression of Long polar fimbriae-encoding genes in the TIM system. *lpf 1/2* expression levels were measured by RT-qPCR in the gastric (**a**) and ileal (**b**) effluents of the TIM under child (in gray) and adult (in black) digestive conditions. Results are expressed as means of fold-induction \pm SEM (n = 4). Time points statistically different from t0 at P < 0.05 (†), P < 0.01 (‡) and P < 0.001 (§). Child statistically different from adult at P < 0.05 (*) and P < 0.01 (**). TIM, TNO gastrointestinal model; RT-qPCR, reverse transcriptase – quantitative PCR.



Figure 7. Gastric and small intestinal TNO gastrointestinal model (TIM). The TIM model is composed of four successive compartments simulating the human stomach (**a**) and the three parts of the small intestine, i.e., the duodenum (**b**), jejunum (**c**) and ileum (**d**).

infection and HUS (1–3). Nevertheless, other extra-digestive factors, such as immaturity of the immune system and higher expression of Stx receptor on the surface of renal cells (39) are also known to contribute to the higher susceptibility of infants to HUS. Besides, it should be noted that the results obtained in this study may be strain-specific (9). To get a more complete

Copyright © 2016 International Pediatric Research Foundation, Inc.

picture of EHEC pathogenesis, similar experiments should be carried out with other non-O157 strains that are also involved in EHEC disease. Such data are essential in the designing of novel therapeutic approaches, particularly in the young children high-risk population.

METHODS

TIM Gastrointestinal Model

The TIM model (TIM2013, TNO, Zeist, Netherlands) consists of four successive compartments simulating the human stomach, duodenum, jejunum, and ileum (Figure 7). The main parameters of digestion, such as body temperature, pH, peristaltic mixing and transport, gastric, biliary, and pancreatic secretions and passive absorption of small molecules and water, are reproduced as accurately as possible. Briefly, each compartment is composed of glass units with a flexible inner membrane. Peristaltic mixing and body temperature are achieved by pumping water at 37°C into the space between the glass jacket and the flexible wall at regular intervals. Mathematical modeling of gastric and ileal deliveries with the Elashoff power exponential equation (f = $1-2^{-(t/t1/2)\beta}$ where t is the time of emptying and β a coefficient describing the shape of the curve) is used for the computer control of chyme transit. Chyme transport through the TIM is regulated by the peristaltic valves that connect the successive compartments. The volume in each compartment is monitored by a pressure sensor and pH is computer-monitored and continuously controlled by adding either HCl or NaHCO₃. Simulated gastric, biliary and pancreatic secretions are introduced into the corresponding compartments by computer-controlled pumps. Water and products of digestion are removed from the jejunal and ileal compartments by pumping dialysis liquid through hollow fibers (SF 09L, Nipro, Zaventem, Belgium; cut-off 10 KDa).

In vitro Digestions

The TIM system was programmed to reproduce, based on *in vivo* data (16–26), the physicochemical digestive conditions observed in a healthy adult or young children (from 6 mo to 2 y) when a glass

Articles

Roussel et al.

Table 1.	Set-point	parameters of	f gastrointesti	nal digestion	s in the TIM s	ystem
			J			

Parameters of <i>in vitro</i>	Adult	Child from 6 mo to 2 y old						
algestion	Gastric compartment (min/nH)	Gastric compartment (min/nH)						
	$t = 10 \rightarrow 3.2$	$t = 10 \rightarrow 5.7$						
	$t = 20 \rightarrow 2.4$	$t = 20 \rightarrow 5.3$						
	$t = 40 \rightarrow 1.8$	$t = 20 \rightarrow 3.5$						
	$t = 60 \rightarrow 1.6$	$t = 60 \rightarrow 3.2$						
рН	$t = 90 \rightarrow 1.5$	$t = 90 \rightarrow 3.2$						
	$r = 50 \rightarrow 1.5$	$r = 50 \rightarrow 2.0$						
	loiunal compartment: 6.9	laiunal compartment: 6.9						
	leal compartment: 7.2	leal compartment: 7.2						
	Based on <i>in vivo</i> nH (14)	Based on <i>in vivo</i> nH (15)						
	Stomachit $-15 \min \beta - 1$	Stomach: $t = -20 \min \beta - 1.2$						
Transit time	However, $r_{1/2} = 150$ min, $\beta = 124$	$l_{1/2} = 2011111, p = 1.2$						
fiansit time	Paced on invive transit time (16.25)	Beend on invite transit time (17.26)						
	Castric comportment ^a							
	Gastric compartmen	120 UU/min of nonzin (10) (DZ012 Cierros Aldrich)						
	Ell/(win of pepsin (18) (P/012 Sigma-Aldrich, St Quentin, France)	Fill/min of linese (10.20) (DC Among Dharman strict)						
	5 IU/min of lipase (18) (DS Amano Pharmaceutical, Alchi, Japan)	5 IU/min of lipase (19,20) (DS Amano Pharmaceutical)						
	0.25 ml/min of HCI 0.3 mol/l (according to pH)	0.25 ml/min of HCI 0.1 mol/l (according to pH)						
	Duodenal compartment							
	Bile salts ^b 4% during the first 30 min and then 2% (21) (B8631 and F48305 Sigma-Aldrich)	Bile salts ^b 1% (22) (B8631 and F48305 Sigma-Aldrich)						
Digestive secretions	Pancreatic juice 7% (18) (P1750 Sigma-Aldrich)	Pancreatic juice 3.5% (23) (P1750 Sigma-Aldrich)						
	Trypsin 3.4 mg (24) (T4665 Sigma-Aldrich)	Trypsin 3 mg (19) (T4665 Sigma-Aldrich)						
	0.25 ml/min of intestinal electrolytes solution	0.25 ml/min of intestinal electrolytes solution						
	0.25 ml/min of NaHCO $_{_3}$ 0.5 mol/l (according to pH)	0.25ml/min of NaHCO $_3 0.5 \text{mol/l}$ (according to pH)						
	Jejunal compartment							
	0.25 ml/min of NaHCO $_{_3}$ 0.5 mol/l (according to pH)	0.25ml/min of NaHCO $_3 0.5 \text{mol/l}$ (according to pH)						
	lleal compartment ^a							
	0.25 ml/min of NaHCO $_{\rm 3}$ 0.5 mol/l (according to pH)	0.25ml/min of NaHCO $_3 0.5 \text{mol/l}$ (according to pH)						
Jejunal and ileal dialysis	10 ml/min	10 ml/min						
Ileal absorption	0.4 ml/min	0.4 ml/min						

The table gives the main parameters of the TNO gastrointestinal model (TIM) when simulating digestive conditions of a healthy adult or child after intake of a glass of water. ^aA power exponential equation ($f = 1-2^{-(t/t_1/2)\beta}$ where *f* represents the fraction of meal delivered, *t* the time of delivery, $t_{1/2}$ the half-time of delivery, and β a coefficient describing the shape of the curve) was used for the computer control of gastric and ileal deliveries. ^bBile is composed of porcine bile extract 1/3 and bile salts 2/3 (deoxycholate and cholate).

of water is ingested (Table 1). The bacterial suspension (200 ml) that was introduced into the TIM system consisted of mineral water experimentally contaminated with the reference strain EHEC O157:H7 EDL 933 (ATCC 43895) at a final concentration of 107 CFU/ml. This strain was isolated from Michigan ground beef that was linked to a multistate US outbreak in 1982 involving contami-nated hamburgers, in which *E. coli* O157:H7 was first associated with human disease (40). Two types of experiments were performed: gastric digestions where the gastric compartment was solely used (total duration of 60 min) and GI digestions using the entire TIM model (total duration of 300 and 360 min for the adult and child protocol, respectively). During digestion, gastric, and ileal effluents were kept on ice and pooled on 0-10, 10-20, 20-40, and 40-60 min for gastric digestions and hour-by-hour for GI digestions. Digestions were run in quadruplicate. Samples were taken in the initial bacterial suspension (t0) and regularly collected during digestion in each digestive compartment (stomach, duodenum, jejunum, and ileum) and/or in the gastric and ileal effluents.

Bacterial Counting

Survival kinetics in each digestive compartment of the TIM model was determined by direct plating onto Luria Bertani (LB) agar (overnight incubation at 37°C). Results were expressed as percentages of initial intake and cross-compared with those obtained with a theoretical nonabsorbable transit marker provided by the TIM system and indicating a 100% survival rate for bacteria. Bacterial curves below that of the transit marker will reflect cell mortality, while curves above the transit marker will be indicative of bacterial growth.

Physiological State of Bacteria

Physiological state of bacteria was determined by a live/dead analysis with flow cytometry. Bacteria from gastric and ileal effluents were double stained (LIVE/DEAD BacLight, Molecular probes, Whaltham, MA) with the green-fluorescent DNA stain SYTO 9 labelling all bacteria and the red-fluorescent Propidium Iodide (PI) only penetrating and staining cells with damaged membranes. Adequate volumes of gastric or ileal effluents were centrifuged

EHEC pathogenicity and child's gut



Table 2. Primers used in RT-qPCR assay

Name	Sequence 5'-3'	Target	Annealing final temperature (°C)	References
VT1c	ACCCTGTAACGAAGTTTGCG	ety/EUEC Shine toyin 1	60	(41)
VT1d	ATCTCATGCGACTACTTGAC	stx i enec sniga-toxin i		
Stx2-F	TTGCTGTGGATATACGAGGGC	atus EUEC China tavia S	60	(42)
Stx2-R	TCCGTTGTCATGGAAACCG	SIX2 EFFEC Shiga-toxin 2		
Eae-F	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC		63	(32)
Eae-R	CCCGAATCCGTCTCGCCAGTATTCG	eae EREC Intimin		
LPF154-F	TATGGCAGGTCACCTACAGG	Inf () major fimbrial suburit I of ()	60	(32)
LPF154-R	AGGTTTCCGGGCATTGAGTC	IPIA2 major imbhai subunit EpiA2		
LPFA141-F	CATCACTATCACCACTAAAGC		60	(32)
LPFA141-R	ATTTACAAGGGCATTCGCTGT			
Eco1457-F	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC		63	(43)
Eco1652-R	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	ios enterodacteriaceae		

EHEC, enterohemorrhagic Escherichia coli; eae, intimin; LPF, long polar fimbriae; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative PCR; Stx, Shiga toxins.

 $(9,000 \times g, 20^{\circ}C, 5 \text{ min})$ and bacterial pellets were suspended in phosphate buffer at pH 7.3 to get a final concentration of ~10⁶ CFU/ml. Bacterial suspensions were incubated for 15 min at room temperature in the dark with SYTO 9 (5 µmol/l) and PI (30 µmol/l), according to the manufacturer's instructions. Flow cytometry analysis was performed on a CyFlow SL cytometer and data were collected with FlowMax software version 2.3 (Partec, Sainte-Geneviève-des-Bois, France). Gating on forward-angle light scatter/side-angle light scatter was used in order to differentiate bacteria from the background, then the combined red and green fluorescence dot-plots were used to distinguish among the various subpopulations. Statistical tables that show percentages of marked cells determined by each detector were used to analyze data.

Expression of Virulence Genes

Reverse transcription (RT)-PCR was used to follow the expression of *stx 1, stx 2, eae, lpf 1*, and *lpf 2* virulence genes in the gastric and ileal effluents of the TIM. Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). RNAs were reversely transcribed using the PrimeScript RT Reagent Kit (TAKARA Bio, Shiga, Japan). q-PCR was performed using SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) on a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Biorad, Hercules, CA) with the specific primers indicated in **Table 2**. *Enterobacteriaceae* rRNA 16S was used as housekeeping gene for quantification of mRNA expression. Foldinduction was calculated using the Ct method as follows:

 $\Delta \Delta Ct = (Ct_{target\,gene} - Ct_{housekeeping\,gene})_{at\,time\,t} - (Ct_{target\,gene} - Ct_{housekeeping\,gene})_{at\,t0}$ and the final data were derived from $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Toxins Production

Stx1 and Stx2 produced by O157:H7 in the ileal effluents of the TIM system were dosed by enzyme-linked immunosorbent assay using the Ridascreen Verotoxin kit (R-Biopharm, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's instructions. Stx concentrations were determined by measuring a change in absorbance of the digestive samples using the Multiskan spectrum reader (Thermo Scientific, Waltham, MA) set at 450 nm. Supernatant from an overnight culture of EDL 933 was used to establish standard calibration curves.

Statistical Analysis

Values are given as means and SEM (n = 4). Significant differences in survival between treatments and time points were testing using a nonparametric analysis of repeated measures with the "f1.ld.f1" function of the R package "nparLD" in R 3.1.2 R (Development Core Team 2015). In case of a significant treatment effect, Tukey contrast effects of survival between the two treatments for each time point were calculated using the function "nparcomp" of the R package "nparcomp". In case of a significant interaction effect, a linear mixed effect model with a random intercept on experiments taking into account the repeated measures was performed and followed by function "diffsmeans" of the package "ImerTest". The kinetics of virulence genes expression was tested with the "Id.f1" function of the R package nparLD. In case of a significant time effect, pairwise comparisons with Bonferroni adjustment were performed.

Ethics Statement

Statement of study approvement by the Institutional Review Board: As this study was only performed in an *in vitro* model, no subject was enrolled and no human sample was used. Therefore, study approvement by our Institutional Review Board was not required.

Statement of subject and/or parental informed consent: As this study was only performed in an *in vitro* model, no subject was enrolled and therefore subject or parental informed consent was not required.

STATEMENT OF FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by grants from Conseil Régional Auvergne (grant CPER T2ANSH ASTERISK, Auvergne STEC Risque) to Charlotte Cordonnier, Wessam Galia, EA CIDAM, VetAgroSup and UMR INSERM/Université d'Auvergne U1071 USC-INRA 2018 and from Lesaffre Company (Marcq-en-Bareuil, France) to Charlène Roussel.

Disclosure: The authors and Lesaffre Company declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Page AV, Liles WC. Enterohemorrhagic Escherichia coli infections and the hemolytic-uremic syndrome. Med Clin North Am 2013;97:681–95.
- Keir LS. Shiga toxin associated hemolytic uremic syndrome. Hematol Oncol Clin North Am 2015;29:525–39.
- Majowicz SE, Scallan E, Jones-Bitton A, et al. Global incidence of human Shiga toxin-producing Escherichia coli infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. Foodborne Pathog Dis 2014;11:447–55.
- Bryan A, Youngster I, McAdam AJ. Shiga toxin producing Escherichia coli. Clin Lab Med 2015;35:247–72.
- McWilliams BD, Torres AG. Enterohemorrhagic Escherichia coli adhesins. Microbiol Spectr 2014;2.
- Barnett Foster D. Modulation of the enterohemorrhagic E. coli virulence program through the human gastrointestinal tract. Virulence 2013;4: 315–23.
- Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S, Blanquet-Diot S, Alric M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. Trends Biotechnol 2012;30:591–600.

Articles

Roussel et al.

- Marteau P, Minekus M, Havenaar R, Huis in't Veld JH. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. J Dairy Sci 1997;80:1031–7.
- Miszczycha SD, Thévenot J, Denis S, et al. Survival of Escherichia coli O26:H11 exceeds that of Escherichia coli O157:H7 as assessed by simulated human digestion of contaminated raw milk cheeses. Int J Food Microbiol 2014;172:40–8.
- Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Privat M, et al. Effect of a new probiotic Saccharomyces cerevisiae strain on survival of Escherichia coli O157:H7 in a dynamic gastrointestinal model. Appl Environ Microbiol 2011;77: 1127–31.
- 11. Tamplin ML. Inactivation of Escherichia coli O157:H7 in simulated human gastric fluid. Appl Environ Microbiol 2005;71:320–5.
- Kaye JL. Review of paediatric gastrointestinal physiology data relevant to oral drug delivery. Int J Clin Pharm 2011;33:20–4.
- 13. Saxena T, Kaushik P, Krishna Mohan M. Prevalence of E. coli O157:H7 in water sources: an overview on associated diseases, outbreaks and detection methods. Diagn Microbiol Infect Dis 2015;82:249–64.
- Koziolek M, Grimm M, Becker D, et al. Investigation of pH and temperature profiles in the GI tract of fasted human subjects using the Intellicap(*) system. J Pharm Sci 2015;104:2855–63.
- Omari TI, Davidson GP. Multipoint measurement of intragastric pH in healthy preterm infants. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2003;88: F517–20.
- Beckers EJ, Leiper JB, Davidson J. Comparison of aspiration and scintigraphic techniques for the measurement of gastric emptying rates of liquids in humans. Gut 1992;33:115–7.
- Euler AR, Byrne WJ. Gastric emptying times of water in infants and children: comparison of those with and without gastroesophageal reflux. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1983;2:595–8.
- Kalantzi L, Goumas K, Kalioras V, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C. Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. Pharm Res 2006;23:165–76.
- DiPalma J, Kirk CL, Hamosh M, Colon AR, Benjamin SB, Hamosh P. Lipase and pepsin activity in the gastric mucosa of infants, children, and adults. Gastroenterol 1991;101:116–21.
- 20. Sarles J, Moreau H, Verger R. Human gastric lipase: ontogeny and variations in children. Acta Paediatr 1992;81:511–3.
- Vertzoni M, Archontaki H, Reppas C. Determination of intralumenal individual bile acids by HPLC with charged aerosol detection. J Lipid Res 2008;49:2690–5.
- 22. Challacombe DN, Edkins S, Brown GA. Duodenal bile acids in infancy. Arch Dis Child 1975;50:837–43.
- 23. Delachaume-Salem E, Sarles H. [Normal human pancreatic secretion in relation to age]. Biol Gastroenterol (Paris) 1970;2:135–46.
- Whitcomb DC, Lowe ME. Human pancreatic digestive enzymes. Dig Dis Sci 2007;52:1–17.
- 25. Worsøe J, Fynne L, Gregersen T, et al. Gastric transit and small intestinal transit time and motility assessed by a magnet tracking system. BMC Gastroenterol 2011;11:145.
- Oikawa-Kawamoto M, Sogo T, Yamaguchi T, et al. Safety and utility of capsule endoscopy for infants and young children. World J Gastroenterol 2013;19:8342–8.

- 27. Chong Y, Fitzhenry R, Heuschkel R, Torrente F, Frankel G, Phillips AD. Human intestinal tissue tropism in Escherichia coli O157: H7–initial colonization of terminal ileum and Peyer's patches and minimal colonic adhesion *ex vivo*. Microbiology 2007;153(Pt 3):794–802.
- Farfan MJ, Cantero L, Vergara A, Vidal R, Torres AG. The long polar fimbriae of STEC O157:H7 induce expression of pro-inflammatory markers by intestinal epithelial cells. Vet Immunol Immunopathol 2013;152: 126–31.
- Schüller S. Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium. Toxins (Basel) 2011;3:626–39.
- Yuk HG, Marshall DL. Adaptation of Escherichia coli O157:H7 to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid acid. Appl Environ Microbiol 2004;70:3500–5.
- Huang YJ, Tsai TY, Pan TM. Physiological response and protein expression under acid stress of Escherichia coli O157:H7 TWC01 isolated from Taiwan. J Agric Food Chem 2007;55:7182–91.
- 32. Yin X, Feng Y, Lu Y, Chambers JR, Gong J, Gyles CL. Adherence and associated virulence gene expression in acid-treated Escherichia coli O157: H7 *in vitro* and in ligated pig intestine. Microbiol 2012;158(Pt 4):1084–93.
- Hamner S, McInnerney K, Williamson K, Franklin MJ, Ford TE. Bile salts affect expression of Escherichia coli O157:H7 genes for virulence and iron acquisition, and promote growth under iron limiting conditions. PLoS One 2013;8:e74647.
- Kus JV, Gebremedhin A, Dang V, Tran SL, Serbanescu A, Barnett Foster D. Bile salts induce resistance to polymyxin in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. J Bacteriol 2011;193:4509–15.
- Krüger A, Lucchesi PM. Shiga toxins and stx phages: highly diverse entities. Microbiol 2015;161(Pt 3):451–62.
- Yin X, Zhu J, Feng Y, Chambers JR, Gong J, Gyles CL. Differential gene expression and adherence of Escherichia coli O157:H7 *in vitro* and in ligated pig intestines. PLoS One 2011;6:e17424.
- House B, Kus JV, Prayitno N, et al. Acid-stress-induced changes in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157: H7 virulence. Microbiology 2009;155(Pt 9):2907–18.
- Arenas-Hernández MM, Rojas-López M, Medrano-López A, et al. Environmental regulation of the long polar fimbriae 2 of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. FEMS Microbiol Lett 2014;357:105–14.
- Chaisri U, Nagata M, Kurazono H, et al. Localization of Shiga toxins of enterohaemorrhagic Escherichia coli in kidneys of paediatric and geriatric patients with fatal haemolytic uraemic syndrome. Microb Pathog 2001;31:59–67.
- 40. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype. N Engl J Med 1983;308:681–5.
- Bonnet R, Souweine B, Gauthier G, et al. Non-O157:H7 Stx2-producing Escherichia coli strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. J Clin Microbiol 1998;36:1777–80.
- 42. Carey CM, Kostrzynska M, Ojha S, Thompson S. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. J Microbiol Methods 2008;73:125–32.
- 43. Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo ME. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. Appl Environ Microbiol 2004;70: 3575–81.

COMMENTAIRES DE LA PUBLICATION N°4

L'objectif de cette étude était d'utiliser le modèle de digestion TIM 1 afin d'évaluer et de comparer la survie et la virulence des EHEC dans des conditions digestives simulant l'adulte ou l'enfant.

Ainsi, les paramètres du TIM 1 pouvant être contrôlés et ajustés, nous avons mis au point un nouveau protocole simulant la digestion de l'enfant de moins de deux ans. Nous avons pu déterminer en comparant avec les conditions « adulte », l'impact de l'environnement digestif de l'enfant sur la survie et la virulence d'une souche EHEC O157:H7. Dans nos travaux, deux gènes de virulence ont été étudiés : les gènes codant le principal facteur de virulence des EHEC et responsable des complications systémiques, les Shiga-toxines (Stx1 et Stx2) et les « Long polar fimbriae » (Lpf), des adhésines supposées être impliquées dans les étapes clefs de la pathogénicité telles que l'adhérence, l'inflammation et l'interaction avec les plaques de Peyer (**publication n°3**).

Mise au point d'un nouveau protocole permettant de reproduire les conditions digestives de l'enfant dans le système TIM 1

Le premier objectif était de mettre en place un protocole *in vitro* pour le modèle TIM 1 reproduisant les conditions digestives des nourrissons après la prise d'un verre d'eau. L'eau a été choisie comme « matrice alimentaire » pour deux raisons: l'eau contaminée a été impliquée dans des grandes épidémies à EHEC (Saxena et *al.*, 2015) et pour des facilités techniques, en particulier l'extraction de l'ARN qui serait plus compliqué si les échantillons digestifs étaient «pollués» par des constituants alimentaires.

Une recherche bibliographique a été réalisée afin d'identifier les paramètres physicochimiques propres au tractus gastro-intestinal du nourrisson et ensuite les appliquer dans le modèle TIM 1. Les études retenues impliquent des nourrissons en bonne santé, âgés de 6 mois à deux ans, qui ont ingérés un repas liquide de préférence de l'eau et dont les paramètres de digestion tel que le temps de transit, ont été approuvés par une large communauté scientifique. Cette tranche d'âge a été retenue selon plusieurs critères : (i) les nourrissons de moins de 3 ans sont une population à haut risque dans les infections à EHEC et en particulier dans le développement du SHU, (ii) les nouveau-nés (moins de 6 mois) ont pour la plupart un régime alimentaire exclusivement composé de lait et en conséquent ont une physiologie digestive particulière adaptée et (iii) les enfants de plus de 2 ans ont un tractus gastro-intestinal mature et donc aucune différence ne serait observée avec la digestion adulte.

Chez l'enfant, l'acidité gastrique diminue plus lentement mais les principales différences entre enfant et adulte ont lieu au niveau intestinal où les concentrations des sécrétions (bile et pancréatique) sont plus faible et le temps de transit augmenté.

Survie des EHEC dans l'environnement digestif simulé de l'enfant

Afin de déterminer l'influence des paramètres digestif « adulte » ou « enfant » sur la survie de O157:H7 EDL933, nous avons évalué et comparé le taux de survie du pathogène dans le TIM 1 dans les deux conditions. La survie de O157:H7 est évaluée au cours du temps, compartiment par compartiment, en utilisant deux techniques complémentaires : par **dénombrement**, en comparant les profils obtenus pour le pathogène avec ceux du marqueur de transit, ces profils variant en fonction de la matrice alimentaire ingérée et par **cytométrie en flux**, qui permet de différencier les cellules viables, mortes et celles ayant une membrane endommagée par les conditions de l'environnement digestif. Nos résultats montrent que les conditions physico-chimiques de l'enfant sont plus favorable à la survie du pathogène dans le tractus gastro-intestinal.

Ces différences peuvent en partie s'expliquer par une acidité gastrique plus rapide et des concentrations intestinales en acide biliaire plus importantes chez l'adulte. L'acidification du pH plus rapide pourrait jouer sur l'activation des systèmes de résistance à l'acidité des EHEC. Les EHEC pourraient ne pas avoir le temps de s'adapter et seraient donc plus sensible au pH gastrique adulte. Ce qui pourrait expliquer que les cellules susceptibles d'atteindre l'intestin grêle sont donc moins endommagées chez l'enfant que chez l'adulte comme nos données en cytométrie en flux le montrent. Comme précédemment décrit par Etienne-Mesmin, Livrelli et *al.* (2011), une croissance bactérienne est observée en fin de digestion. Cette croissance est beaucoup plus marquée dans les conditions « enfant » et corrèle avec une meilleure viabilité des cellules. Ce taux de mortalité plus élevé chez l'adulte pourrait être lié aux concentrations plus élevées en sels biliaires qui ont un effet bactéricide sur les *E. coli* bien documenté

entraînant une perturbation de l'intégrité de la membrane cellulaire (Merritt et Donaldson, 2009). De plus, la croissance bactérienne plus élevée observée chez l'enfant peut être expliquée par la présence de conditions moins stressantes que chez l'adulte : temps de transit plus court ainsi que la viabilité plus importante des bactéries chez l'enfant suite au passage dans le compartiment gastrique. L'ensemble de ces résultats suggère que les conditions physico-chimiques du tractus gastro-intestinal supérieur chez l'enfant permettent au pathogène une meilleure survie et sont moins stressantes pour les bactéries. De ce fait, une plus grande quantité de bactérie peut atteindre les parties distales de l'intestin grêle et du côlon chez les enfants, supposés être les principaux sites d'action des EHEC (Chong et *al.*, 2007 ; Mariani-Kurkdjian et Bonacorsi, 2014). Cette étude est la première montrant que seules les conditions physico-chimiques du tractus gastro-intestinal peuvent expliquer en partie la plus grande susceptibilité des enfants de moins de trois ans aux infections à EHEC.

Le modèle TIM 1 est le plus proche des réalités physiologiques. Néanmoins, ce modèle ne permet pas d'estimer l'influence de l'épithélium intestinal et de la maturation du système immunitaire intestinal dans la susceptibilité de l'enfant aux infections à EHEC. De plus, le TIM 1 est un modèle dépourvu du microbiote intestinal. Avant trois ans, l'enfant n'a pas un microbiote mature de l'adulte or le microbiote a de nombreux rôle dans le renforcement de la barrière épithéliale intestinale (Otte et Podolsky, 2004), protège contre l'invasion de bactéries pathogènes (Duerkop et *al.*,2009) et participe aussi à la maturation de l'épithélium et du système immunitaire associé à la muqueuse intestinale (Hooper et *al.*, 2004). L'étude de l'ensemble de ces caractéristiques permettrait de mieux comprendre la susceptibilité des enfants de moins de trois ans aux infections à EHEC.

Expression des gènes de virulence des EHEC dans l'environnement digestif gastro-intestinal simulé de l'adulte et de l'enfant

À ce jour, la virulence des EHEC dans l'environnement digestif n'avait été suivie que dans des approches *in vitro* simpliste où un seul paramètre à la fois était pris en compte tels que la valeur du pH ou la présence de sels biliaires. De plus, aucune étude n'a été faite dans des conditions digestives de l'enfant.

Nous avons étudié l'expression du principal gène de virulence responsable des symptômes les plus graves : les gènes stx1 et stx2 codant la Shiga-toxine. Dans les effluents gastriques enfants, les gènes stx1 et stx2 sont significativement surexprimés tout au long de la digestion par rapport à la condition adulte. Les conditions moins acides dans l'estomac chez l'enfant peuvent expliquer en parties cette surexpression. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Yuk et Marshall (2004) et Huang et al. (2007) qui ont montré une diminution de la production de Stx chez O157:H7 en condition acide, cependant en modèle de porc d'anses iléales, Yin et al. (2012) ont observé l'effet inverse de l'acidité. De plus, les niveaux d'expression sont significativement supérieurs pour Stx1 par rapport à Stx2 ce qui laisse penser que des mécanismes différents sont mis en place dans la régulation transcriptionnelle de ces gènes (Calderwood et Mekalanos, 1987; Wagner et al., 2001; Schüller 2011). Au niveau iléal, la surexpression de stx semble être supérieure en condition enfant mais aucune différence significative n'est observée par rapport à l'adulte étant donné la variabilité des données. En accord avec ces résultats, la quantité de Shiga-toxines produite augmente régulièrement dans les effluents iléaux « enfant » mais est indétectable par ELISA chez l'adulte ceci étant certainement dû à des concentrations trop faible pour être détectées. La neutralité du pH suite aux conditions acides de l'estomac peut expliquer cette surexpression chez les deux modèles. Les sels biliaires ne semblent pas être impliqué puisque lorsqu'ils sont ajoutés à du milieu de culture LB aucune influence sur l'expression des gènes stx n'est observée (Hamner et al., 2013 ; Kus et al., 2011). Enfin de manière globale, comme nous l'avons montré précédemment la meilleure viabilité des cellules bactériennes dans les conditions « enfant » peut expliquer aussi en partie la surexpression des stx dans les conditions « enfant » par rapport à celles « adulte ».

Nous avons aussi suivi l'expression des sous-unités majeures A des Lpf des deux opérons (OI141 et OI154) décrits chez O157:H7 EDL933. L'expression des *lpf* dans les conditions gastriques et intestinales « adulte » a été décrit précédemment (**publication n°3**). Nos résultats montrent que l'expression des *lpf* est supérieure dans les conditions digestives de l'enfant. De manière intéressante, ces résultats indiquent que sans contact avec des cellules hôtes, l'environnement digestif suffit à induire l'expression d'adhésines bactériennes. Les sels biliaires et un pH neutre ont été décrit comme des facteurs activateurs de l'expression des *lpf* chez les AIEC (Chassaing et *al.*, 2013) mais aussi chez les EHEC (Torres et *al.*, 2007 ; Arenas-Hernández et *al.*, 2014, **publication n°3**). La concentration en sels biliaires chez l'enfant est moins concentrée cependant les conditions digestives chez l'enfant semblent induire plus

fortement l'expression des gènes *lpf* que chez l'adulte. Les Lpf ne sont pas les adhésines majeures ; en effet, l'intimine codée par le gène *eae* est responsable des lésions d'attachement et effacement à la surface des entérocytes. Il serait donc intéressant d'étudier son expression induite par les conditions physico-chimiques du tractus digestif de l'adulte et de l'enfant.
TROISIÈME PARTIE

- Discussion et Conclusion générale -

Les *E. coli* entérohémorragiques sont des pathogènes zoonotiques responsables de toxiinfections alimentaires pouvant évoluer vers des atteintes potentiellement mortelles chez l'Homme, comme le syndrome hémolytique et urémique. La survie des EHEC et l'expression des gènes de virulence dans l'environnement digestif humain, ainsi que leur interaction avec le microbiote résident et l'épithélium intestinal, sont des facteurs essentiels dans la physiopathologie de ces infections mais restent à ce jour mal connus. Pour des raisons évidentes d'éthique, des études sur le comportement des EHEC dans l'environnement digestif sont impossibles chez l'Homme et les modèles *in vivo* chez l'animal ne peuvent reproduire le spectre complet de la physiopathologie de l'infection (Ritchie, 2015 ; Mohawk et O'Brien, 2011).

À ce jour, la survie et la virulence des EHEC dans l'environnement digestif humain ont été évalués principalement dans des systèmes *in vitro* statiques ne prenant en compte qu'un paramètre digestif à la fois – tels que le pH, la présence de sels biliaires, les métabolites produits par le microbiote – donc dans des conditions restant éloignées de celles rencontrées chez l'Homme (Hamner et *al.*, 2013 ; Yin et *al.*, 2012 ; Schüller, 2011 ; Barnett Foster, 2013). Des travaux réalisés précédemment au laboratoire dans des modèles *in vitro* multi-compartimentés et dynamiques ont néanmoins permis d'évaluer la survie de la souche de référence *E. coli* O157:H7 EDL 933 dans l'estomac et l'intestin grêle simulés chez l'adulte en présence d'une matrice alimentaire (Etienne-Mesmin, Livrelli et *al.*, 2011) et dans l'environnement colique *in vitro* dans des fermenteurs ensemencés avec le microbiote fécal d'un unique donneur adulte (Thévenot et *al.*, 2013).

L'étude et la recherche des facteurs de virulence impliqués dans les interactions des EHEC avec l'épithélium intestinal sont également nécessaires pour une meilleure compréhension de la physiopathologie des infections à EHEC. À l'aide de culture d'organe *in vitro* de biopsies intestinales humaines, Phillips et *al.* (2000) ont décrit un tropisme particulier des EHEC pour l'épithélium du follicule associé qui recouvre les plaques de Peyer de l'intestin grêle. Des travaux précédents au laboratoire ont permis par ailleurs de montrer que dans un modèle de culture *in vitro* de cellules M, les EHEC sont capables de transloquer au niveau de ces cellules présentes à la surface des plaques de Peyer et *in vivo* dans un modèle d'anses iléales murines, les EHEC interagissent préférentiellement avec les plaques de Peyer (Etienne-Mesmin, Chassaing et *al.*, 2011). Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans ce ciblage restent mal connus.

Par ailleurs, l'absence de traitement spécifique a conduit à s'intéresser à des moyens préventifs et/ou curatifs alternatifs, comme l'utilisation de probiotiques, et notamment de levures du genre *Saccharomyces*. À ce jour, la majorité des travaux réalisés ont évalué l'effet bénéfique de *Saccharomyces cerevisiae* var *boulardii* (Dahan et *al.*, 2003 ; Dalmasso et *al.*, 2006). Dans le cadre de travaux précédemment réalisés au laboratoire en modèles digestifs *in vitro*, nous avons pour notre part évalué l'effet antagoniste d'une autre souche *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856. Il est ainsi été montré, dans le système TIM 1, que cette levure diminuait significativement la reprise de croissance d'O157:H7 observée dans les parties distales de l'intestin grêle artificiel (Etienne-Mesmin, Livrelli et *al.*, 2011). Cependant, l'administration simultanée de *S. cerevisiae* et O157:H7 dans des conditions coliques *in vitro* n'a montré aucun effet du probiotique sur la survie du pathogène (Thévenot et *al.*, 2013).

Les travaux réalisés au cours de cette thèse s'inscrivent dans la continuité de ces précédentes études.

Dans un premier temps, l'objectif était de poursuivre **l'étude du comportement des** souches EHEC au cours de leur transit dans l'environnement digestif humain et plus particulièrement d'étudier l'expression des gènes de virulence du pathogène et d'étudier son interaction avec le microbiote résident et l'épithélium intestinal, à l'aide d'approches *in vitro* et *in vivo* complémentaires.

Ainsi, à l'aide du modèle de digestion artificiel TIM 1, nous avons évalué **dans le tractus digestif supérieur humain simulé** la survie de souches EHEC et l'expression des gènes codant deux facteurs de virulence majeurs du pathogène (les Shiga-toxines et les « Long polar Fimbriae »), en conditions digestives adulte et enfant simulées, lorsque les bactéries sont ingérées en présence d'un verre d'eau (et non d'une matrice alimentaire comme dans les travaux précédents) (**Article 3, Article 4**). Nous avons dû, dans le cadre de ces travaux, adapter le modèle TIM 1, afin de simuler les conditions digestives de l'enfant de moins de trois ans, population présentant un risque accru de développer les complications les plus graves lors d'infections à EHEC (SHU). L'objectif de cette comparaison adulte/enfant était ainsi d'essayer de mieux comprendre le rôle des paramètres physico-chimiques du tractus digestif supérieur dans la plus grande susceptibilité des enfants aux infections à EHEC (**Article 4**).

Puis, à l'aide de fermenteurs de type semi-continus (modèle ARCOL) ensemencés avec un microbiote fécal humain, nous avons évalué **dans l'environnement colique humain simulé**, le taux de survie et la régulation des principaux gènes de virulence des EHEC (codant les Shigatoxines et l'intimine) et étudié les interactions entre le pathogène et le microbiote colique (**Article 2**). Ces expériences ont été réalisées avec un inoculum fécal issu de trois donneurs adultes (et non d'un unique donneur comme dans les expériences précédentes).

Enfin, l'étude des **interactions des EHEC avec l'épithélium intestinal**, et plus particulièrement les Plaques de Peyer, a été poursuivie à l'aide de deux approches : un modèle *in vitro* original de cellules M en culture et un modèle *in vivo* d'anses iléales murines. Nous avons plus particulièrement étudié l'implication d'un facteur de virulence particulier, les « Long polar fimbriae », dans l'interaction des EHEC avec les cellules M ou les plaques de Peyer (**Article 3**).

Dans un second temps, nous avons poursuivi les travaux précédemment réalisés au laboratoire avec la levure probiotique *S. cerevisiae* CNCM I-3856. Nous avons tout d'abord évalué la survie du probiotique tout au long du tractus digestif humain en utilisant les modèles *in vitro* TIM 1 et ARCOL et étudié les interactions entre le probiotique et le microbiote colique (Article 1). Puis, nous avons évalué l'effet antagoniste du probiotique sur la survie et la virulence des EHEC dans l'environnement colique humain *in vitro*, lorsque le probiotique est administré préalablement au pathogène (et non co-administré comme dans les études précédentes) (Article 2) et sur les interactions du pathogène avec l'épithélium intestinal dans un modèle *in vivo* d'anses iléales murines (Article 2).

PATHOGÉNICITÉ DES EHEC dans l'environnement digestif humain simulé

1. Survie et virulence des EHEC dans l'environnement digestif

1.1 Survie des EHEC au cours du transit gastro-intestinal in vitro

Pour coloniser un hôte et déclencher une pathologie, les EHEC doivent être capables de survivre aux conditions digestives drastiques rencontrées au cours de leur transit dans le tractus digestif humain. Etant donné que la dose infectieuse des EHEC est très faible, de l'ordre de 50 à 100 microorganismes, la résistance et la tolérance aux conditions digestives chez l'homme sont un point important de la virulence des EHEC.

Estomac

L'acidité gastrique (pH compris entre 1,5 et 5) est le premier système de défense de l'organisme contre les micro-organismes pathogènes. Nous avons montré, dans le système TIM 1, que les EHEC O157:H7 résistent à l'acidité gastrique, que ce soit en conditions adulte ou enfant simulées, lorsqu'ils sont ingérés avec de l'eau. Cinq systèmes de résistance à l'acidité (AR1 à AR5) ont été décrits chez E. coli, cette résistance dépendent entre autres du régulateur général de réponse au stress σ^s codé par le gène *rpoS* et de la protéine de régulation CRP (protéine récepteur du cAMP) (Bearson, Lee, et Casey 2009). Les systèmes de résistance à l'acidité sont dépendants des conditions de culture et de la phase de croissance bactérienne mais répondent aussi différemment pour favoriser la survie des EHEC soit dans l'aliment, soit dans le tractus intestinal (Lin et al., 1996; Price et al., 2004; Foster, 2004; van Elsas et al., 2011). Il serait intéressant d'étudier l'expression des facteurs rpoS et CRP au cours de la digestion dans le TIM 1 dans le but de mieux comprendre la régulation des systèmes de résistance à l'acidité des EHEC dans l'environnement gastrique humain. Lors de travaux antérieurs réalisés au laboratoire, nous avions observé une sensibilité en milieu gastrique de la souche d'E. coli O157:H7 testée. Ces différences de résultats peuvent s'expliquer (i) par la nature des souches, un double mutant délété des gènes stx1 et stx2 ayant été précédemment utilisé, (ii) par la dose, un inoculum de 2,5x10⁵ UFC/mL ayant été administré lors des premières expériences (versus 10⁷ UFC/mL dans notre travail), ou (iii) par la nature de la matrice alimentaire, les expériences ayant été réalisées en présence d'un repas complet et non d'eau (Etienne-Mesmin, Livrelli et *al.*, 2011).

Intestin grêle

Nous avons également montré une perte de viabilité d'O157:H7 dans le duodénum (uniquement dans les conditions adultes et non dans les conditions enfants), suivie d'une croissance dans les parties distales de l'intestin grêle, principalement dans l'iléon (plus importante chez l'enfant que chez l'adulte). Cette multiplication dans l'iléon peut s'expliquer par la présence de conditions environnementales moins agressives pour les bactéries, comme des concentrations plus faibles en sels biliaires et un pH proche de la neutralité. En effet, les sels biliaires sont des détergents qui peuvent être toxiques à des concentrations élevées en désorganisant la bicouche lipidique des membranes bactériennes (Thanassi et *al.*, 1997). Leur réabsorption importante au niveau de l'iléon pourrait expliquer le développement des bactéries dans ce compartiment.

Côlon

Dans l'environnement colique humain *in vitro*, une élimination progressive du pathogène est observée, qui ne se maintient pas au cours du temps dans le fermenteur. Ces données sont en adéquation avec celles précédemment obtenues au laboratoire avec un inoculum fécal issu d'un unique donneur (Thévenot et *al.*, 2013) et corrèlent avec les données cliniques. En effet, Tarr et *al.* (1990) ont montré que le recueil des selles de patients atteints de SHU devait s'effectuer au maximum quatre à six jours après le début des syndromes digestifs pour que l'analyse soit contributive. L'élimination des EHEC du milieu colique résulterait d'un effet « barrière » direct ou indirect (production de molécules inhibitrices) du microbiote intestinal humain. En effet, il a été montré que des souches d'*E. coli* commensales produisent des colicines inhibant la croissance des EHEC (Callaway et *al.*, 2004 ; Schamberger et *al.*, 2004).

Peu de données concernant les interactions entre microbiote intestinal humain et EHEC sont disponibles à ce jour. Nos résultats suggèrent que l'influence des EHEC sur le microbiote colique pourrait être individu dépendant, même si un nombre plus important de donneurs et une analyse plus poussée du microbiote seraient nécessaires pour confirmer cette tendance. Ces résultats laissent penser que des facteurs associés à l'hôte, comme le microbiote intestinal, pourraient influencer l'évolution clinique des infections à EHEC, comme précédemment suggéré par d'autres auteurs (Ashida et *al.*, 2012 ; Keeney et Finlay 2011 ; de Sablet et *al.*, 2009 ; Gamage et *al.*, 2003 ; Toshima et *al.*, 2007).

Les AGCC sont les principaux métabolites produits par le microbiote colique. Dans notre étude, suite à l'administration des EHEC, aucune modification de l'activité métabolique fermentaire n'a pu être mise en évidence par le dosage des AGCC. En sens inverse, en modulant certaines populations bactériennes, l'activité métabolique du microbiote pourrait être modifiée et influencer la survie des EHEC : cela permettrait d'établir un « microbiote bénéfique ». En effet, en modèle murin, un effet inhibiteur du microbiote intestinal sur les EHEC a été observé *via* la production d'acides organiques comme l'acétate et le lactate (Momose et *al.*, 2008).

Il est connu que la composition de la flore digestive se caractérise par des variations spatiales au sein d'un même individu (Hayashi et *al.*, 2005) en particulier entre les différentes régions du côlon. À ce jour, les essais ont été réalisés dans un modèle colique mono-étagé. Des expérimentations complémentaires dans un modèle autorisant un accès différentiel aux différentes régions anatomiques du côlon humain, comme celui développé à l'EA-CIDAM (ECSIM; Feria-Gervasio et *al.*, (2014)), permettraient donc de mieux appréhender la physiopathologie des EHEC dans l'environnement colique humain. Il serait également intéressant de tester l'influence du microbiote colique humain sur certains aspects de la physiopathologie des infections à EHEC (survie, inflammation, colonisation et translocation bactérienne) accessibles dans un modèle de souris gnotoxéniques humanisées avec les selles de nos donneurs.

Conditions enfants

D'après nos résultats, les EHEC sont capables de s'adapter à l'acidité gastrique mais semblent sensibles aux fortes concentrations en sels biliaires présents dans le duodénum. Les conditions digestives de l'enfant sont moins drastiques que celles de l'adulte, avec une chute de pH gastrique moins prononcée et moins rapide que chez l'adulte et des concentrations en sels biliaires plus faibles. Nous avons observé qu'un plus grand nombre de cellules et de surcroit en meilleur état physiologique (plus de cellules viables et moins de cellules avec une membrane altérée) est retrouvé dans les effluents iléaux de l'enfant comparativement à l'adulte. Le site préférentiel d'action des EHEC étant à priori l'iléon terminal et le côlon (Chong et *al.*, 2007; Mariani-Kurkdjian et Bonacorsi, 2014), ces données apportent un premier élément de réponse permettant d'expliquer la plus grande sensibilité des enfants aux infections à EHEC.

Lors de ces travaux, nous avons utilisé la cytométrie de flux pour évaluer l'état physiologique des EHEC au cours du transit gastro-intestinal, grâce à des marqueurs permettant de distinguer les cellules viables, mortes ou présentant une membrane endommagée. De nouveaux essais pourront être conduits pour mieux appréhender l'état physiologique du pathogène, grâce à des marqueurs permettant d'évaluer le pH intracellulaire ou le potentiel de membrane (Bouix et Ghorbal, 2015 ; Chekabab et al., 2012 ; Tracy et al., 2010 ; Yang et al., 2010). La proportion des cas d'infections intestinales à EHEC qui évoluent vers un SHU est plus importante chez l'enfant et les personnes âgées (Mariani-Kurkdjian et Bonacorsi, 2014). Une perspective intéressante à ce travail serait donc d'étudier le comportement des EHEC dans le tractus digestif supérieur (TIM 1) en intégrant des données spécifiques (temps de transit, pH, concentration en enzymes digestives) à la digestion de la personne âgée. De plus, le vieillissement est associé à une augmentation du temps de transit intestinal et une modification de la composition et de l'activité du microbiote colique (Woodmansey et al., 2004). On sait également que le microbiote des enfants de moins de 3 ans présente une composition différente de celle de l'adulte (Koleva et al., 2015). La survie et la virulence des EHEC dans l'environnement colique, ainsi que leur interaction avec le microbiote résident pourraient donc être étudiées en inoculant le fermenteur ARCOL avec des selles issues d'enfants ou de personnes âgées.

1.2 Virulence des EHEC au cours du transit gastro-intestinal in vitro

Estomac-Intestin grêle

Dans ce travail, nous nous sommes également intéressés à la régulation des facteurs de virulence des EHEC dans le tractus digestif supérieur en utilisant le modèle TIM 1. Nous avons montré pour la première fois que l'expression des gènes codant deux principaux facteurs de virulence, les Shiga-toxines (Stx) et les « Long Polar Fimbriae » (Lpf) est activée dans les

conditions rencontrées dans l'estomac et l'intestin grêle, principalement dans les conditions digestives simulées de l'enfant. Les résultats obtenus au niveau de l'expression des gènes codant les Stx ont été confortés par ceux obtenus par dosage des toxines, puisque aucune toxine n'a pu être détectée dans les conditions adultes alors que des quantités croissantes sont produites au cours de la digestion chez l'enfant dans les effluents iléaux. Ces résultats montrent que, bien que l'iléon terminal et le côlon soient les sites d'action majeurs du pathogène, l'expression de certains facteurs de virulence peut-être initiée dès l'estomac. Ils montrent également que la surexpression d'adhésines comme les Lpf peut-être induite, même en absence de cellules intestinales. De plus, le fait que les niveaux d'expression des gènes de virulence soient plus élevés chez l'enfant comparativement à l'adulte pourrait également contribuer à expliquer la grande sensibilité des enfants aux infections à EHEC.

Le pH gastrique et la présence de sels biliaires au niveau de l'intestin sont les principaux paramètres physico-chimiques dans notre modèle *in vitro* pouvant influencer l'expression des gènes de virulence des EHEC. Deux études par analyse transcriptomique ont permis de montrer l'influence de ces paramètres sur l'expression des gènes d'une souche O157:H7. House et *al.* (2009) ont ainsi montré que l'expression des gènes de virulence associés à l'adhésion, la mobilité et le système de sécrétion de type III (TTSS impliqué dans les lésions A/E) variait selon la nature et la durée d'exposition à un stress acide. Ainsi, la chute du pH gastrique plus lente chez l'enfant pourrait être un paramètre expliquant les différences d'expression des gènes *stx* et *lpf* observés entre l'adulte et l'enfant. Quant à l'effet des sels biliaires, Kus et *al.* (2011) ont montré que le gène *stx2* est sous-exprimé en présence de sels biliaires ce qui concorde avec notre étude : une plus forte expression de *stx* est observée en conditions enfant où les concentrations en sels biliaires sont plus faibles.

L'unique production de Stx est jugée insuffisante pour induire l'ensemble des aspects de la physiopathologie des infections à EHEC. Il serait intéressant d'évaluer l'expression d'autres gènes de virulence tels que les gènes impliqués dans la formation des lésions A/E ou des gènes permettant la survie des EHEC dans le tractus gastro-intestinal tels que les gènes de résistance à l'acidité. L'utilisation d'une biopuce transcriptomique intégrant l'ensemble des gènes du génome et du plasmide pO157 de la souche *E. coli* O157:H7 EDL933 permettrait de suivre dans sa globalité la régulation des gènes de virulence, en conditions digestives humaines simulées.

Côlon

L'expression des gènes de virulence codant les Stx et l'intimine (impliquée dans les lésions A/E) est augmentée dans un environnement colique humain simulé, comparativement aux conditions initiales. Ces résultats montrent encore une fois que la présence de cellules intestinales ne semble pas requise pour induire l'expression de facteurs d'adhésion comme l'intimine. Les conditions physico-chimiques propres à l'environnement colique pourraient à elles-seules expliquer l'induction de l'expression des gènes de virulence. En effet, Polzin et al. (2013) ont montré dans un milieu in vitro, exempt de microbiote et simulant les conditions physico-chimiques coliques, une augmentation de l'expression de facteurs de virulence comme EspP et EspB impliqués dans les lésions A/E, comparativement à une culture en milieu nutritif simple. D'autres études ont montré que la régulation des gènes de virulence des EHEC était dépendante de la présence du microbiote colique et de certaines espèces particulières. De Sablet et al. (2009) ont montré que le microbiote humain pouvait inhiber la transcription de stx2 en réprimant la transcription du régulateur majeur du système SOS (la protéine RecA) même lors de l'induction de ce dernier, et que cette inhibition peut être en partie attribuée à l'espèce Bacteroides thetaiotaomicron. Iversen et al. (2015) ont montré, au contraire, que cette espèce bactérienne induisait l'expression des gènes impliqués dans les lésions A/E.

1.3 Limites des modèles in vitro utilisées et perspectives

Concentrations cellulaires

Afin de pallier des contraintes techniques et permettre notamment l'étude du transcriptome des EHEC, nous avons dû utiliser des concentrations supra-physiologiques en bactéries, de l'ordre de 10⁷ UFC/mL. Seule une cinquantaine de bactéries peut suffire à induire un processus infectieux. On peut supposer que ces concentrations très élevées peuvent influencer la survie et la virulence des EHEC. En effet, le quorum sensing est un mécanisme permettant la synchronisation de l'expression ou de la répression de gènes spécifiques via la production de signaux moléculaires, des auto-inducteurs. Lorsque la densité de la population bactérienne est faible, l'auto-inducteur est diffus dans l'environnement alors qu'avec une forte densité, la plus forte concentration de l'auto-inducteur lui permet d'être perçu par les bactéries et d'agir sur ses gènes cibles et notamment des gènes de virulence (Walters et Sperandio, 2006).

Conditions d'oxygénation

Les différents compartiments du système TIM 1 sont en aérobiose, alors qu'in vivo un gradient décroissant de concentration en oxygène s'établit le long du tractus digestif parallèlement à une augmentation de la densité bactérienne (bien qu'une zone d'oxygénation existe au voisinage de la surface de la muqueuse, générée par diffusion de l'oxygène à partir du réseau de capillaires des microvillosités). La capacité de l'oxygène à moduler la virulence des EHEC dans l'environnement digestif humain est très peu connue. Néanmoins, il a été récemment montré in vitro que l'environnement microaérobie de l'intestin humain favorise la macropinocytose de Stx2 à travers l'épithélium intestinal avec des teneurs en oxygène comprises entre 1,4 et 1,7% (Tran et al., 2014). De plus, par une approche protéomique, Polzin et al. (2013) ont montré, en cultivant E. coli O157:H7 EDL 933 dans un milieu in vitro simulant les conditions physico-chimiques iléales en microaérobie (2% d'oxygène), une augmentation de la biosynthèse de plusieurs protéines comme LuxS impliquée dans la formation d'AI-2 (molécule signalisatrice de quorum sensing inter-espèces), comparativement à une culture dans du TSB (« tryptic soy broth »). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet d'une réduction des concentrations en oxygène (en insufflant de l'azote dans les compartiments de l'intestin grêle) sur l'expression des facteurs de virulence des EHEC dans le TIM 1.

Forces de cisaillement

Le brassage du chyme dans les différents compartiments du TIM 1 est reproduit par compression des parois flexibles grâce à un système d'eau sous pression. *In vivo*, les forces de cisaillement peuvent évoluer le long de tractus digestif et de la lumière intestinale à la muqueuse. Ces variations ne sont pas prises en compte dans le modèle TIM 1. L'influence de ces forces de cisaillement sur la virulence des EHEC est très peu connue. Récemment, Alsharif et *al*. (2015) ont montré *in vitro* qu'en présence de forces de cisaillement, équivalentes à celles retrouvées au niveau de l'intestin, les gènes du LEE sont surexprimés et que cela corrélait avec une augmentation de l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales. A l'heure actuelle, les modèles *in vitro* gastriques HGS (Human Gastric Simulator) et TIM-agc (TIM-advanced gastric compartment) et le modèle SHIME sont ceux intégrant le plus fidèlement possible ces forces de cisaillement (Kong et Singh; 2010 ; Minekus; 2015 ; Marzorati et *al*.; 2014). Ces modèles pourraient permettre l'étude de l'influence de ces forces mécaniques sur l'expression des gènes *stx*.

Microbiote résident

Une des principales limites du TIM 1 est l'absence de microbiote au sein des compartiments reproduisant l'intestin grêle. Des expériences visant à implanter et stabiliser un microbiote iléal dans le système TIM 1 sont en cours de développement (Stolaki, 2010). L'importance du microbiote de l'intestin grêle, et plus particulièrement de l'iléon, sur la survie des EHEC et la régulation des gènes de virulence dans le tractus digestif supérieur pourrait ainsi être évaluée.

De plus, le modèle *in vitro* ARCOL utilisé ne reproduit que la partie luminale de l'environnement colique. Or, il est connu que la composition du microbiote luminal est différente de celle du microbiote muqueux (Vermeiren et *al.*, 2012). En particulier, les populations bactériennes associées au mucus dans le côlon ascendant comprennent des membres de *Clostridium* cluster XIVa (Vermeiren et *al.*, 2012) qui ont la capacité de biosynthétiser du butyrate (Bernalier-Donadille, 2010), connu pour activer simultanément les gènes du LEE et des gènes flagellaires des souches EHEC (Tobe et *al.*, 2011). Plusieurs modèles *in vitro* intègrent à ce jour ces microenvironnement sous la forme de tubes en verre contenant un gel de mucine (Macfarlane et *al.*, 2005) ou de microcosmes couverts de mucine (Van den Abbeele et *al.*, 2012). Ces dispositifs sont adaptables sur le modèle ARCOL et pourraient être utilisés dans l'avenir pour mieux appréhender les interactions des EHEC avec le microbiote résident luminal et mucosal. Un transfert technologique a d'ailleurs déjà été initié avec l'Université de Ghent (Gand, Belgique) afin d'adapter leur système de microcosmes sur notre modèle ARCOL.

Interactions avec l'hôte

Nos modèles *in vitro* sont dépourvus de cellules intestinales. Nous avons pu constater que la présence de cellules épithéliales n'est pas indispensable pour induire une augmentation de l'expression des facteurs de virulence. Néanmoins, afin de pouvoir étudier les interactions hôte/pathogène, il serait intéressant de coupler les modèles *in vitro* TIM 1 et ARCOL avec des cellules en culture, comme cela l'a déjà été fait pour le système de Macfarlane et Gibson (Bahrami et *al.*, 2011) ou le SHIME (Marzorati et *al.*, 2014). Dans ce cadre, un couplage avec le module HMI – module bi-compartimenté avec une double couche fonctionnelle composée de mucus disposée sur une membrane de polyamide semi-perméable permettant une culture

d'entérocytes en interaction indirecte avec le milieu fermentaire – (Marzorati et *al.*, 2014) développé à l'Université de Ghent serait idéal pour étudier le comportement des EHEC dans l'environnement colique muqueux, en conditions microaérobies et en prenant en compte les forces de cisaillement, et ce, tant au niveau transcriptomique que protéomique. Les interactions indirectes hôte-microbiote/pathogène pourraient également être étudiées en observant l'influence du sécrétome bactérien et ses effets immunomodulateurs sur les cellules intestinales en culture.

2. Interaction des EHEC avec la muqueuse intestinale

Long Polar Fimbriae et Plaques de Peyer

Un tropisme particulier des EHEC avec les plaques de Peyer et plus particulièrement les cellules M a été décrit, les mécanismes moléculaires restant à définir (Phillips et *al.*, 2000 ; Etienne-Mesmin, Chassaing, et *al.*, 2011). Les données obtenues dans le modèle TIM-1 montrent que la reprise de croissance d'*E. coli* O157:H7 s'accompagne d'une augmentation de l'expression des gènes *lpf* au niveau de l'intestin grêle, localisation préférentielle des plaques de Peyer. Nous avons également observé une diminution significative de la translocation via les cellules M pour des mutants isogéniques délétés des gènes *lpf*. De même, une diminution significative des interactions avec les plaques de Peyer a été observée dans un modèle *in vivo* d'anses iléales murines pour ces mutants. La trans-complémentation des mutants restaure leur capacité à interagir avec les cellules M et avec les plaques de Peyer. Ces résultats indiquent que Lpf sont essentiels pour l'interaction des EHEC avec les plaques de Peyer murines *in vivo*.

Des études complémentaires seraient nécessaires dans le but d'étudier quelles voies de signalisation sont activées/réprimées au niveau de l'épithélium intestinal suite à la l'interaction de la souche EHEC sauvage comparativement à la souche délétée des gènes *lpf*, ainsi que les conséquences d'un tel processus sur la mise en place d'une réponse immunitaire mucosale. En effet, plusieurs études ont montré que les Lpf induisaient *in vitro* une réponse inflammatoire au niveau des cellules de l'épithélium intestinal (Farfan et *al.*, 2013 ; Vergara et *al.*, 2014) mais

aucune donnée *in vivo* n'est disponible. Des expérimentations sur des souris infectées par la souche sauvage O157:H7 EDL933 ou les mutants *lpf* pourraient donner des informations complémentaires sur l'implication des Lpf dans la réponse immunitaire induite. De plus, il n'existe aucune donnée sur les gènes impliqués dans la survie des EHEC au sein des plaques de Peyer. Le gène *gipA* (*growth in Peyer's patches*), identifié chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, permettrait la survie des bactéries au sein des plaques de Peyer (Stanley et *al.*, 2000), comme cela vient d'être décrit chez les souches AIEC (Vazeille et *al.*, 2015). L'étude du rôle de ce facteur chez les souches EHEC dans leur capacité de survie *in vivo* au sein des plaques Peyer pourrait être envisagée en délétant ce gène dans la souche sauvage. De plus, l'étude de la prévalence de *gipA*, ainsi que l'étude de la corrélation entre la présence de l'opéron *lpf* et du gène *gipA* au sein d'une collection de souches EHEC pourraient s'avérer intéressantes pour la compréhension de la physiopathologie des infections à EHEC.

Long Polar Fimbriae et environnement digestif

Nous avons montré dans le système TIM 1 que la présence des sels biliaires activait l'expression des gènes *lpf* et donc le pouvoir d'interaction des EHEC avec les plaques de Peyer (Philipps et *al.*, 2000 ; Etienne-Mesmin, Chassaing et *al.*, 2011). En effet, les sels biliaires libérés au niveau du duodénum par le canal provenant de la vésicule biliaire sont par la suite réabsorbés au niveau de l'iléon terminal, conduisant ainsi à une très faible concentration en acides biliaires au niveau colique (Hofmann, 1999). Ainsi, les acides biliaires retrouvés au niveau iléal, et impliqués dans l'activation de l'expression des *lpf* chez les bactéries EHEC, pourraient être un facteur environnemental clef pour l'activation de la virulence des bactéries EHEC, ainsi que pour leur tropisme iléal.

Dans le but de mieux comprendre l'importance de la régulation de l'expression des *lfp* chez les souches EHEC en conditions gastro-intestinales, il pourrait être intéressant de développer des souches possédant des gènes rapporteurs sous la dépendance des promoteurs des gènes *lpf* et d'étudier leur comportement en modèle murin, afin de confirmer *in vivo*, dans les différents compartiments, les données obtenues dans l'environnement digestif simulé.

Parmi les « stress » rencontrés dans le tractus digestif supérieur, il est connu que la bile peut influencer l'expression des facteurs de virulence de plusieurs pathogènes entériques (Chassaing et *al.*, 2013 ; Kus et *al.*, 2011 ; Malik-Kale et *al.*, 2008 ; Prouty et *al.*, 2004 ; Hung

et Mekalanos, 2005). L'analyse par biopuce transciptomique du génome d'O157:H7 cultivée *in vitro* en « batch » en présence de sels biliaires a révélé une surexpression de différents gènes impliqués dans des voies métaboliques ou de virulence (Kus et *al.*, 2011). L'influence des sels biliaires sur la survie et la régulation des gènes de virulence des EHEC, dont les gènes *lpf*, pourrait être évaluée en réalisant les mêmes expériences *in vitro* dans le TIM-1, mais sans apport de sels biliaires, et en comparant les données obtenues dans les deux cas. De même, des expériences de ligation du canal biliaire (Huang et *al.*, 2011) pourraient être réalisées chez l'animal. Cette opération chirurgicale conduit à une absence complète de sécrétion biliaire au niveau iléal. Suite à l'infection de tels modèles murins, l'importance de la présence de sels biliaires sur la survie et la croissance des EHEC, sur l'expression des *lpf* et sur la virulence de ces bactéries pourrait être étudiée. L'utilisation du modèle *Amacr-/-*, modèle murin invalidé pour le gène codant l'enzyme *alpha methylacyl coenzyme A racemase* essentielle pour la biosynthèse des acides biliaires (Savolainen et *al.*, 2004) pourrait également être envisagée.

Long Polar Fimbriae et stratégie thérapeutique

Une autre perspective à ce travail serait d'identifier les récepteurs aux Lpf exprimés à la surface des cellules M. Des souches de *Lactobacillus acidophilus* sont capables d'adhérer aux plaques de Peyer, et ces interactions sont inhibées en présence de carbohydrates tels que le mannose (Sun et *al.*, 2010). Des lectines à la surface des Lactobacilles seraient donc capables de reconnaître spécifiquement des résidus mannose à la surface des plaques de Peyer. Des travaux préliminaires ont été mis en œuvre au laboratoire afin de déterminer l'effet des carbohydrates sur l'interaction des EHEC avec les plaques de Peyer et nos premiers résultats indiquent un rôle potentiel du mannose et de fucose. Ces travaux seront poursuivis afin d'identifier précisément les récepteurs mis en jeu et d'envisager des stratégies thérapeutiques innovantes. L'analyse de l'expression des récepteurs chez des personnes plus susceptibles aux infections à EHEC telles que les enfants ou les personnes âgées, ou ayant développé les symptômes lors d'une infection, comparativement à des sujets sains pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de susceptibilité aux infections.

Des stratégies thérapeutiques innovantes visant à bloquer l'expression des Lpf au niveau iléal pourraient également être étudiées. Il serait nécessaire d'identifier des molécules pouvant bloquer l'assemblage des Lpf, comme cela a été suggéré pour les pili de type 1 chez les *E. coli* uropathogènes *via* l'utilisation des pilicides (Aberg et Almqvist, 2007 ; Hedenström et *al.*,

2005 ; Svensson et *al.*, 2001). Les pilicides sont des molécules qui ciblent la fonction de chaperonne et inhibent la synthèse des pili. D'autres molécules ont montré des effets inhibiteurs de la synthèse des adhésines Dr (blocage du système chaperonne-usher FGL) (Piatek et *al.*, 2013) ou des curli (Cegelski et *al.*, 2009), prévenant également la formation de biofilm.

INFLUENCE D'UN TRAITEMENT PROBIOTIQUE À BASE DE LEVURE S. CEREVISIAE CNCM I-3856

L'absence de traitement spécifique des infections à EHEC et le fait que l'antibiothérapie soit controversée (Panos et *al*:, 2006 ; Ulinski, 2013 ; Wong et *al*., 2000) ont conduit à s'intéresser à des moyens préventifs et/ou curatifs alternatifs comme l'utilisation de probiotiques. La levure *S. cerevisiae* CNCM I-3856 – commercialisée sous le nom de Lynside[®] Pro GI + par la société Lesaffre Human Care – a été retenue au cours de cette thèse et son effet antagoniste vis-à-vis des EHEC évalué à l'aide d'approches *in vitro* et *in vivo* complémentaires.

De précédents travaux ont permis de montrer certaines propriétés antagonistes de cette levure vis-à-vis de souches d'*Escherichia coli* pathogènes, dont les EHEC. En effet, elle permet d'inhiber l'expression de gènes pro-inflammatoires induits par les ETEC et d'exercer une interaction physique (agglutination) entre le pathogène et les levures (Zanello et *al.*, 2011). De plus, des travaux ont également montré l'intérêt de cette levure dans le traitement de la maladie de Crohn. En effet, l'administration de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 permet de réduire la colite induite par des bactéries AIEC chez des souris exprimant le récepteur CEACAM6 (CarcinoEmbryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 6). L'administration du probiotique pourrait donc être envisagée dans un sous-groupe de patients atteints de la maladie de Crohn et exprimant anormalement ce récepteur (Sivignon et *al.*, 2014). Enfin, au sein du laboratoire, Etienne-Mesmin, Chassaing et *al.*, (2011) ont montré un effet inhibiteur de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 sur la reprise de croissance d'*E. coli* O157:H7 observée dans les parties distales de l'intestin grêle dans le modèle de digestion artificielle TIM 1.

1. Survie de S. cerevisiae CNCM I-3856 dans l'environnement digestif humain

Un probiotique se définit comme un « microorganisme vivant qui, lorsqu'il est administré en quantité suffisante, exerce un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (FAO/WHO, 2002 ; Hill et *al.*, 2014). La viabilité étant un critère essentiel pour l'activité des probiotiques dans l'environnement digestif, la survie de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 a été tout d'abord évaluée au cours de son transit dans le tractus gastro-intestinal humain à l'aide des modèles in vitro TIM-1 et ARCOL. Les doses de probiotiques testées au cours de ces travaux sont celles administrées chez l'homme lors d'essais cliniques (Desreumaux et *al.*, 2011).

Estomac-Intestin grêle

Une viabilité proche de 100% a été observée dans les effluents iléaux du TIM 1 et cette survie n'est pas influencée par la matrice alimentaire. Du fait de sa forte tolérance aux conditions rencontrées dans le tractus digestif supérieur (et notamment au pH acide et aux sels biliaires), *S. cerevisiae* CNCM I-3856 apparaît comme un bon candidat pour une application thérapeutique au niveau des parties distales de l'intestin grêle, qui est le site d'action de nombreux agents infectieux intestinaux comme les EHEC mais aussi les ETEC. Cette levure présente donc un avantage par rapport à d'autres souches comme les bactéries lactiques qui sont des probiotiques à large spectre antimicrobiens mais sont le plus souvent sensibles au pH acide de l'estomac (Kailasapathy et Chin, 2000). Nos données indiquent également que le probiotique peut-être ingéré dans de l'eau ou un repas complet de manière indifférente. Comme nous l'avons signalé précédemment, une des limites du système TIM 1 est l'absence de microbiote intestinal, il serait ainsi intéressant de s'assurer que, en présence de ce microbiote, la levure conserve dans le tractus digestif supérieur, des taux de survie aussi élevés.

Côlon

Contrairement aux résultats obtenus dans le tractus digestif supérieur, malgré une administration biquotidienne du probiotique, *S. cerevisiae* CNCM I-3856 ne se maintient pas dans le milieu colique à des concentrations semblables à celles de l'inoculum. Ces données de survie *in vitro* corroborent celles obtenues *in vivo* chez l'Homme pour différentes souches de *S. cerevisiae* où une élimination rapide des levures est observée dans les échantillons fécaux

dès l'arrêt du traitement (Klein et *al.*, 1993 ; Pecquet et *al.*, 1991). Cette élimination est certainement liée à l'« effet barrière » du microbiote colique. La capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale est un des critères de sélection des probiotiques parce qu'elle est considérée comme une condition préalable à la colonisation et la croissance. Bien que les levures du genre *Saccharomyces* semblent présenter des capacités d'adhésion, celles-ci ne semblent pas suffisantes pour assurer une colonisation efficace du probiotique.

2. Influence de S. cerevisiae CNCM I-3856 dans le traitement des infections à EHEC

Au cours de cette thèse, nous avons évalué l'effet antagoniste de la souche probiotique de levure *S. cerevisiae* CNCM-I 3856 vis-à-vis des EHEC. Les probiotiques peuvent exercer leur effet bénéfique via trois mécanismes d'actions majeurs: (i) l'antagonisme direct, (ii) l'exclusion et (iii) l'immunomodulation (Bermudez-Brito et *al.*, 2012). Dans les paragraphes suivants, les effets antagonistes de la souche de levure étudiée vis-à-vis d'*E. coli* O157:H7 ont été répertoriés selon ces trois mécanismes d'action.

2.1 Antagonisme direct

Les probiotiques peuvent agir par antagonisme direct, c'est-à-dire en inhibant la croissance du pathogène ou l'expression de gènes impliqués dans la virulence (Preidis et *al.*, 2011). Préalablement à ces travaux de thèse, il avait été montré au laboratoire, dans le modèle TIM 1, que la levure *S. cerevisiae* CNCM I-3856 pouvait significativement inhiber la croissance d'*E. coli* O157:H7 observée en fin de digestion dans le jéjunum et l'iléon (Etienne-Mesmin, Livrelli et *al.*, 2011). Le mécanisme n'avait pas été élucidé, mais il avait été suggéré que la levure pouvait soit produire des molécules, comme l'éthanol, qui aurait une activité inhibitrice (Czerucka et *al.*, 2007), certainement en synergie avec d'autres constituants du milieu digestif, soit par compétition pour l'utilisation de nutriments. Dans notre étude, nous avons montré que

l'administration du probiotique préalablement à celle du pathogène n'influençait pas la cinétique d'élimination des EHEC de l'environnement colique dans le modèle ARCOL. L'effet inhibiteur observé dans la partie haute du tractus digestif n'a donc pas été retrouvé dans la partie colique. Cette différence s'explique peut-être par la présence du microbiote résident dans le modèle ARCOL, absent du modèle TIM 1, comme déjà souligné précédemment. Néanmoins, nous avons pu observer une inhibition de l'expression des gènes codant les Stx en présence des levures probiotiques dans l'environnement colique simulé. Afin de mieux comprendre cet effet inhibiteur des levures, il serait intéressant de refaire des essais avec des cellules de levures mortes, afin d'évaluer si la viabilité des microorganismes est requise pour exercer leur effet antagoniste. Néanmoins, les données obtenues en termes de modulation de l'activité du microbiote intestinal (augmentation de la production d'acétate), nous permettent d'avancer une hypothèse concernant cet effet inhibiteur, comme décrit dans le paragraphe suivant.

Par ailleurs, une perspective intéressante à ce travail serait d'évaluer l'effet des levures probiotiques sur la survie et la virulence de souches EHEC dans le tractus digestif supérieur en conditions digestives simulées de l'enfant.

2.2 Exclusion

Les probiotiques peuvent également exercer leur action antagoniste vis-à-vis des pathogènes en altérant l'environnement dans lequel ils évoluent. Ainsi, ils peuvent moduler d'une manière bénéfique la composition et/ou l'activité du microbiote intestinal, peuvent limiter l'adhésion ou la translocation du pathogène à travers l'épithélium intestinal ou améliorer la fonction barrière de l'épithélium intestinal (Preidis et *al.*, 2011). Plusieurs de ces stratégies ont été évaluées au cours de la thèse.

Modulation du microbiote intestinal

Nous avons donc étudié l'influence de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 sur la composition et l'activité métabolique du microbiote colique implanté dans le modèle ARCOL, en présence d'*E. coli* O157:H7. Nos résultats suggèrent que l'effet de la levure probiotique sur le microbiote colique serait individu dépendant. Néanmoins, nos résultats doivent être confirmés avec un plus

grand nombre de donneurs et à l'aide de techniques de séquençage haut débit permettant d'obtenir une vision plus complète des modifications potentielles du microbiote (Vanhoutte et *al.*, 2006). Quoi qu'il en soit, les modifications observées au niveau du microbiote des différents donneurs ne sont pas corrélées avec un effet du probiotique sur la survie des EHEC, qui n'est pas modifiée quel que soit l'inoculum fécal.

Nous avons donc, dans un second temps, évalué l'effet du probiotique sur l'activité métabolique du microbiote. Nous avons montré que l'administration de S. cerevisiae CNCM I-3856 (en présence du pathogène) permettait de moduler de manière bénéfique l'activité fermentaire du microbiote intestinal, en augmentant la production d'acétate et en diminuant celle du butyrate. En effet, le butyrate est connu pour activer simultanément les gènes du LEE et des gènes flagellaires des souches EHEC (Tobe et al., 2011) alors que la production d'acides organiques, comme l'acétate, conduit à une acidification du milieu associée à une diminution de la survie du pathogène et à une inhibition de l'expression des gènes stx (Asahara et al., 2004 ; Carey et al., 2008 ; Fukuda et al., 2011). Dans le modèle ARCOL, le pH est mesuré et ajusté finement en fonction du pH de consigne. Ainsi, nous n'avons pas pu observer d'acidification du milieu fermentaire dans notre modèle d'étude. Toutefois, aucune différence de volume journalier de soude introduite dans les bioréacteurs n'a pu être mise en évidence entre les différents traitements. Ainsi, l'effet inhibiteur observé vis-à-vis de l'expression des gènes stx, même s'il est peut-être lié à une production d'acétate, n'est pas médié par une diminution du pH du milieu colique. Des variations similaires (augmentation de l'acétate et diminution du butyrate) avaient été précédemment observées lors de l'étude de Thévenot et al. (2013) où les levures étaient administrées sur la base d'un traitement « curatif » (coadministration) et non préventif. Ces données suggèrent que l'administration curative de probiotique serait suffisante pour induire les mêmes modifications de l'activité fermentaire du microbiote que le traitement préventif.

À ce jour, nous avons évalué l'influence du probiotique sur le microbiote colique d'adultes. Une perspective intéressante à ce travail serait d'évaluer l'impact de la souche de levure sur la survie des EHEC dans l'environnement colique simulé du jeune enfant, connu pour être différents de celui de l'adulte (Woodmansey et *al.*, 2004), et sur la composition et l'activité métabolique de ce microbiote.

Inhibition des interactions avec l'épithélium intestinal

Les principaux sites d'action suggérés chez l'Homme pour les EHEC sont l'iléon terminal et le côlon (Chong et al., 2007 ; Mariani-Kurkdjian et Bonacorsi, 2014), avec un tropisme particulier pour les plaques de Peyer (Phillips et al., 2000). Etienne-Mesmin, Chassaing et al. (2011) ont aussi montré que l'épithélium du follicule associé aux plaques de Peyer devient hémorragique en présence du pathogène suite à l'action des Stx. Des études précédentes ont montré in vivo en modèle murin et in vitro en culture cellulaire que certaines souches probiotiques peuvent augmenter la fonction barrière de l'épithélium intestinal en cas d'infections par des EHEC (Turpin et al., 2010 ; Fukuda et al., 2011 ; Johnson-Henry et al., 2008 ; Putaala et al., 2008). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'influence d'un traitement préventif à base de S. cerevisiae CNCM I-3856 sur la translocation d'E. coli O157:H7 EDL 933 au travers de l'épithélium iléal murin dans un modèle in vivo d'anses iléales. Nous avons montré pour la première fois que l'administration du probiotique limite significativement l'interaction du pathogène avec les plaques de Peyer, mais pas avec l'épithélium de la muqueuse. L'administration de la levure prévient également l'hémorragie des plaques de Peyer associée à une infection à EHEC. Nous pouvons donc supposer que ce traitement préventif à base de levures probiotiques permettrait de limiter à la fois la translocation des bactéries et de leurs toxines.

A ce stade, la méconnaissance des mécanismes par lesquels les EHEC ciblent préférentiellement les plaques de Peyer rend difficile la compréhension du mécanisme d'action des levures. Toutefois, des données de la littératures indiquent que des probiotiques du genre *Saccharomyces* peuvent piéger certaines bactéries entéropathogènes, comme *Salmonella Typhimurium*, et ainsi diminuer leur translocation au travers de l'épithélium (Martins et *al.*, 2007 ; Tiago et *al.*, 2013). Dans ce cadre, l'adhésion des EHEC à la surface de *S. boulardii* a déjà été observée (Gedek, 1999). Ce mécanisme d'adhésion des bactéries à la surface des levures ne semble pas nécessiter la viabilité des probiotiques et serait dépendant de la présence de mannose (Tiago et *al.*, 2012).Par ailleurs, Sun et al. ont également montré que la présence de résidus mannose à la surface de l'épithélium du follicule associé aux plaques de Peyer murines était utilisé par *Lactobacillus acidophilus* (Sun et *al.*, 2010).

Des résultats complémentaires à notre étude ont montré que la levure *S. cerevisiae* CNCM I-3856 ne pouvait pas piéger à sa surface *E. coli* O157:H7. L'effet inhibiteur observé provient donc certainement soit d'un effet d'encombrement stérique, soit d'une compétition entre le probiotique et le pathogène pour un récepteur à la surface des plaques de Peyer. Afin d'étudier plus spécifiquement ces mécanismes d'action, nous avons mis au point un test *in vitro* en plaque (**FIGURE 48**) : une biopsie de muqueuse intestinale murine avec ou sans Plaques de Peyer a été mise en contact en présence soit du pathogène seul, soit de la levure seule, soit des deux ensembles. En présence du probiotique, une inhibition de l'interaction des EHEC avec les plaques de Peyer a été observée. Cette inhibition ne se retrouve pas au niveau de la muqueuse dépourvue de plaques de Peyer. Ces résultats, concordants avec ceux obtenus *in vivo*, nous permettent de valider notre modèle. L'intérêt de ce dernier est d'évaluer directement l'effet de l'ajout de substances, tels que des carbohydrates, sur les interactions entre un microorganisme et l'épithélium intestinal. Ainsi, lors de nos tests, l'ajout de mannose diminue l'interaction d'O157:H7 avec les plaques de Peyer mais aussi avec la muqueuse intestinale. Malgré l'intérêt de ces premiers résultats, des expériences complémentaires doivent être réalisées, telles que établir un effet-dose ou tester différents carbohydrates, avant de pouvoir conclure sur l'influence du mannose sur les interactions des EHEC avec l'épithélium intestinal.



FIGURE 48. Test *in vitro* de compétitivité dans l'interaction avec la muqueuse intestinale.

Après sacrifice, des biopsies de muqueuse intestinale avec ou sans plaques de Peyer ont été récupérées et réparties en plaque 96 puits. Les tissus ont été infectés par les bactéries seules ou en présence de molécules à tester (probiotique ou carbohydrate) 1h à 37°C. Une fois les tissus lavés et broyés, les échantillons ont été étalés puis les microorganismes interagissant avec le tissu ont été dénombrés.

Par ailleurs, afin de déterminer l'importance du microbiote sur cet aspect de la physiopathologie, l'utilisation de souris gnotoxéniques humanisées avec les selles de nos donneurs (ou d'enfants) serait intéressante. L'utilisation de souris axéniques permettrait également d'observer l'influence de l'immaturité des plaques de Peyer.

2.3 Immunomodulation

Enfin, les probiotiques peuvent exercer leurs effets bénéfiques en modulant la réponse immunitaire de l'hôte (Preidis et *al.*, 2011). L'infection à EHEC induit une réponse inflammation colique caractérisée par la sécrétion de cytokines pro inflammatoires comme l'Interleukine-8 (IL-8) ou le TNF- α (Pearson et Hartland, 2014). *S. cerevisiae* CNCM I-3856 a déjà montré des propriétés anti-inflammatoires dans un modèle de colite induite chez la souris (Foligné et *al.*, 2010) et lors d'infection à ETEC en modèle *in vitro* de cellules intestinales, en diminuant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Zanello et *al.*, 2011). Bien que l'immunomodulation soit un des mécanismes majeurs pouvant être utilisé par les souches probiotiques, cet aspect n'a pas été évalué au cours de ce travail de thèse.

Dans un futur proche, nous envisageons d'utiliser des modèles cellulaires, seuls ou couplés avec nos modèles de digestion *in vitro*, afin d'évaluer l'effet immunomodulateur des levures probiotiques lors d'une infection à EHEC. Bien que plus pratique et fréquemment utilisée, l'évaluation de la réponse immunitaire de cellules sanguines à une stimulation par des probiotiques ne représente pas la réalité physiologique alors que l'étude de la réponse de cellules intestinales s'avère être un meilleur choix. Le profil de cytokines sécrétées par les lymphocytes, entérocytes et/ou cellules dendritiques mis en contact avec la souche probiotique *S. cerevisiae* CNCM I-3856 et les souches d'EHEC pourrait être établi. Ceci permettrait d'évaluer si la dite souche exerce ou non une action anti-inflammatoire dans un contexte d'infection à EHEC. Si oui, des études plus approfondies pourront être réalisées afin de déterminer les modes d'action précis des probiotiques sur l'immunité de la muqueuse intestinale et systémique.

3. Probiotiques : perspectives d'utilisation dans les infections à EHEC

Au cours de ce travail de thèse, nous avons envisagé l'utilisation de probiotiques dans la prévention et/ou le traitement des infections à EHEC, dans le cas où ceux-ci seraient administrés chez l'homme. Chez l'homme, l'utilisation la plus appropriée de tels probiotiques serait certainement de les administrer aux populations à risque (jeunes enfants, personnes âgées) lors de cas sporadiques ou d'épidémies à EHEC, comme un complément aux traitements symptomatiques disponibles. Une autre possibilité serait de traiter l'entourage immédiat des personnes infectées dans le but de minimiser ou de prévenir les transmissions secondaires. Par ailleurs, les probiotiques pourraient également être donnés aux patients souffrant de diarrhées aqueuses, afin de prévenir les complications systémiques potentielles dans le cas où une infection à EHEC serait confirmée.

Les probiotiques sont disponibles sous forme de compléments alimentaires (en comprimés, gélules ou poudres) ou comme aliment probiotique avec une allégation de santé (e.g. yaourt) (Foligné et *al.*, 2013). En ce qui concerne les EHEC, aucune étude n'a estimé l'influence de la forme galénique sur l'action antagoniste des probiotiques et très peu ont évalué l'activité des probiotiques lorsqu'ils sont administrés dans un véhicule alimentaire (Arena et *al.*, 2014 ; Russo et *al.*, 2014), laissant un large champ d'investigation. En particulier, il serait intéressant d'étudier l'influence du mode d'administration sur l'activité antagoniste des probiotiques contre des souches EHEC dans l'environnement digestif humain simulé. Selon l'utilisation prévue d'un probiotique, un médicament ou un complément alimentaire, les exigences réglementaires diffèrent (Hoffmann, 2013 ; Venugopalan et *al.*, 2010 ; Miquel et *al.*, 2015). Le scénario le plus probable pour les probiotiques dans le traitement des infections à EHEC chez l'Homme est leur commercialisation comme médicament, ce qui imposerait la démonstration de leur l'efficacité et de leur innocuité.

L'utilisation de probiotiques pourrait également être étendue à l'ensemble de la chaîne alimentaire, depuis le réservoir des EHEC, en passant par les vecteurs de contamination à savoir les aliments, jusqu'à l'homme. Le tractus gastro-intestinal des bovins étant le principal réservoir des EHEC, de nombreuses stratégies de lutte basées sur le développement de probiotiques chez l'animal, en particulier de bactéries lactiques, ont déjà été envisagées afin de diminuer le portage et l'excrétion fécale du pathogène et ainsi réduire les risques de dissémination dans l'environnement et de contamination de l'homme (Brashears, Jaroni et *al.*, 2003 ; Brashears,

Galyean et *al.*, 2003 ; Chaucheyras-Durand et Durand, 2010 ; Tkalcic et *al.*, 2003). L'addition de souches de bactéries ou de levures possédant des propriétés inhibitrices directement dans les aliments à risque (steaks hachés ou fromages) semble également être une piste intéressante dans la lutte contre les infections à EHEC. Ainsi, il pourrait être envisagé d'enrichir en probiotiques des aliments, en particulier ceux impliqués dans les épidémies majeures. Des résultats prometteurs ont été observés dans un modèle de souris ayant reçu un yaourt enrichi en *Lactobacillus acidophilus* La-5, où une diminution de l'expression des gènes de virulence codant les toxines, le TTSS ou des gènes du quorum sensing des EHEC O157:H7 ont été observés (Zeinhom et *al.*, 2012). Ces premiers résultats chez l'animal laissent entrevoir la possibilité d'extrapoler ces effets à l'homme.

Enfin, afin de potentialiser les effets observés dans notre étude pour la levure *S. cerevisiae* CNCM-I 3856, on pourrait envisager d'évaluer l'effet antagoniste vis-à-vis des EHEC soit d'un « cocktail » de souches probiotiques (associant par exemple bactéries et levures), soit d'une association de notre souche probiotique avec des probiotiques (synbiotique). Néanmoins, avant de réaliser de nouvelles études *in vivo* et *in vitro* dans les modèles de digestion artificielle, un pré-screening de prébiotiques et de souches probiotiques candidats devra être réalisé (e.g. activité anti-bactérienne, production de molécules inhibitrices, test d'adhésion et/ou activité immunomodulatrice).

CONCLUSION GÉNÉRALE



FIGURE 49. Comportement des EHEC au cours de leur transit dans l'environnement digestif humain.

En modèles digestifs *in vitro*, la souche EHEC O157:H7 survit dans l'estomac voire se multiplie dans les parties distales de l'intestin grêle, alors qu'elle ne se maintient pas dans l'environnement colique mais module de façon individu-dépendante les principales populations microbiennes. Les gènes de virulence codant les Stx et les Lpf sont surexprimés dans les parties hautes du tractus digestif humain. Les conditions rencontrées dans le tractus digestif supérieur de l'enfant, comparativement celui de l'adulte, conduisent à une survie et une expression des gènes codant Stx et Lpf plus élevées. Enfin, les Lpf semblent jouer un rôle clef dans le ciblage spécifique des cellules M et le tropisme des EHEC pour les plaques de Peyer.



FIGURE 50. Influence de la levure probiotique *S. cerevisiae* CNCM I-3856 dans les infections à EHEC

Le probiotique ne modifie pas la survie du pathogène dans l'environnement colique mais est capable de moduler de façon individu-dépendant les principales populations microbiennes coliques, de moduler favorablement l'activité fermentaire du microbiote colique (augmentation du niveau d'acétate et diminution de celui de butyrate) et de diminuer l'expression des gènes *stx*. De plus, le probiotique est capable d'inhiber spécifiquement l'interaction des EHEC avec les plaques de Peyer.

Pour conclure, nous avons ainsi montré, dans des modèles digestifs *in vitro*, qu'une souche EHEC de sérotype O157:H7 peut survivre dans l'estomac, voire de se multiplier dans les parties distales de l'intestin grêle, alors qu'elle ne peut se maintenir dans l'environnement colique. Pour la première fois, nous avons aussi mis en évidence que des gènes de virulence majeurs comme ceux codant les Stx ou des adhésines (intimine et Lpf) sont surexprimés dès les parties hautes du tractus digestifs, et ce, même en absence de cellules de la muqueuse digestive. Nos résultats montrent également que les conditions rencontrées dans l'environnement digestif de l'enfant, comparativement à celui de l'adulte, conduisent à une survie et un niveau d'expression des gènes codant les Stx et les Lpf plus élevés chez l'enfant, ce qui peut contribuer à expliquer la grande sensibilité de cette population aux infections à EHEC. Enfin, à l'aide de modèles *in vitro* et *in vivo* de l'épithélium intestinal, nous avons montré que les Lpf jouent un rôle clé dans le ciblage spécifique des cellules M et le tropisme des EHEC pour les plaques de Peyer.

Parallèlement, nous avons montré que la levure probiotique *S. cerevisiae* CNCM I-3856 semble être un bon candidat potentiel dans une stratégie de lutte contre les infections à EHEC. En effet, cette levure présente un taux de survie très élevé dans l'estomac et l'intestin grêle humain simulé et a montré des propriétés antagonistes intéressantes vis-à-vis du pathogène à différents niveaux : (i) elle diminue significativement l'expression des gènes *stx* dans l'environnement colique *in vitro*, (ii) elle module de manière bénéfique l'activité métabolique du microbiote colique et (iii) elle inhibe la translocation bactérienne au travers des plaques de Peyer et les lésions hémorragiques associées *in vivo* dans un modèle murin d'anses iléales.

L'ensemble des travaux présentés au cours de cette thèse a permis d'obtenir, à l'aide d'approches complémentaires *in vitro* et *in vivo*, des éléments nouveaux sur la survie et la virulence des EHEC dans l'environnement digestif humain simulé et l'intérêt d'une stratégie probiotique dans la lutte contre le pathogène. Une meilleure connaissance de la pathogénicité des EHEC, et leur maîtrise tout au long de la chaîne de transmission grâce à des stratégies alternatives, comme l'utilisation de probiotiques, constituent des enjeux majeurs, non seulement sur le plan de la santé publique, mais aussi sur le plan économique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

\mathcal{A}

- Aberg, V and Almqvist, F 2007, Pilicides-small molecules targeting bacterial virulence, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 5, (12), pp. 1827–1834.
- Abreu, MT 2010, Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function, *Nature Reviews Immunology*, 10, (2), pp. 131–144.
- Adlerberth, I and Wold, A 2009, Establishment of the gut microbiota in Western infants, *Acta Pædiatrica*, 98, (2), pp. 229–238.
- Aguirre, M, Ramiro-Garcia, J, Koenen, ME and Venema, K 2014, To pool or not to pool? Impact of the use of individual and pooled fecal samples for in vitro fermentation studies, *Journal of Microbiological Methods*, 107, pp. 1–7.
- Ahn, J, Yang, L, Paster, BJ, Ganly, I, Morris, L, Pei, Z and Hayes, RB 2011, Oral Microbiome Profiles: 16S rRNA Pyrosequencing and Microarray Assay Comparison, *PLoS ONE*, 6, (7), p. e22788.
- Alam, M, Midtvedt, T and Uribe, A 1994, Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 29, (5), pp. 445–451.
- Alava, P, Du Laing, G, Tack, F, De Ryck, T and Van De Wiele, T 2015, Westernized diets lower arsenic gastrointestinal bioaccessibility but increase microbial arsenic speciation changes in the colon, *Chemosphere*, 119, pp. 757–762.
- Alava, P, Tack, F, Laing, GD and de Wiele, TV 2012, HPLC-ICP-MS method development to monitor arsenic speciation changes by human gut microbiota, *Biomedical chromatography: BMC*, 26, (4), pp. 524–533.
- Allsopp, P, Possemiers, S, Campbell, D, Oyarzábal, IS, Gill, C and Rowland, I 2013, An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from Agave angustifolia and the associated anticancer activity, *Anaerobe*, 22, pp. 38–44.
- Almeida, A, Possemiers, S, Boone, MN, De Beer, T, Quinten, T, Van Hoorebeke, L, Remon, JP and Vervaet, C 2011, Ethylene vinyl acetate as matrix for oral sustained release dosage forms produced via hot-melt extrusion, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V, 77, (2), pp. 297–305.
- de Almeida, PDV, Grégio, AMT, Machado, MAN, de Lima, AAS and Azevedo, LR 2008, Saliva composition and functions: a comprehensive review, *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 9, (3), pp. 72–80.
- Alminger, ML, Eklund-Jonsson, C, Kidman, S and Langton, M 2012, Starch microstructure and starch hydrolysis in barley and oat tempe during in vitro digestion, *Food digestion*, 3, (1-3), pp. 53–62.
- Alsharif, G, Ahmad, S, Islam, MS, Shah, R, Busby, SJ and Krachler, AM 2015, Host attachment and fluid shear are integrated into a mechanical signal regulating virulence in Escherichia coli O157:H7, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, (17), pp. 5503–5508.
- Anfora, AT, Haugen, BJ, Roesch, P, Redford, P and Welch, RA 2007, Roles of serine accumulation and catabolism in the colonization of the murine urinary tract by Escherichia coli CFT073, *Infection and Immunity*, 75, (11), pp. 5298–5304.
- Anson, NM, van den Berg, R, Havenaar, R, Bast, A and Haenen, GR 2009, Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility, *Journal of Cereal Science*, 49, (2), pp. 296–300.
- Anson, NM, Havenaar, R, Bast, A and Haenen, GR 2010, Antioxidant and anti-inflammatory capacity of bioaccessible compounds from wheat fractions after gastrointestinal digestion, *Journal of cereal science*, 51, (1), pp. 110–114.
- Anson, NM, Selinheimo, E, Havenaar, R, Aura, A-M, Mattila, I, Lehtinen, P, Bast, A, Poutanen, K and Haenen, GRMM 2009, Bioprocessing of wheat bran improves in vitro bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, (14), pp. 6148–6155.
- Antoni, L, Nuding, S, Wehkamp, J and Stange, EF 2014, Intestinal barrier in inflammatory bowel disease, *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20, (5), pp. 1165–1179.
- Arena, MP, Russo, P, Capozzi, V, López, P, Fiocco, D and Spano, G 2014, Probiotic abilities of riboflavinoverproducing Lactobacillus strains: a novel promising application of probiotics, *Applied Microbiology* and Biotechnology, 98, (17), pp. 7569–7581.
- Arenas-Hernández, MM, Rojas-López, M, Medrano-López, A, Nuñez-Reza, KJ, Puente, JL, Martínez-Laguna, Y and Torres, AG 2014, Environmental regulation of the long polar fimbriae 2 of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7, *FEMS microbiology letters*, 357, (2), pp. 105–114.
- Arroyo-López, FN, Blanquet-Diot, S, Denis, S, Thévenot, J, Chalancon, S, Alric, M, Rodríguez-Gómez, F, Romero-Gil, V, Jiménez-Díaz, R and Garrido-Fernández, A 2014, Survival of pathogenic and lactobacilli species of fermented olives during simulated human digestion, *Frontiers in Microbiology*, 5, p. 540.
- Arumugam, M, Raes, J, Pelletier, E, Le Paslier, D, Yamada, T, Mende, DR, Fernandes, GR, Tap, J, Bruls, T, Batto, J-M, Bertalan, M, Borruel, N, Casellas, F, Fernandez, L, Gautier, L, Hansen, T, Hattori, M, Hayashi, T, Kleerebezem, M, Kurokawa, K, Leclerc, M, Levenez, F, Manichanh, C, Nielsen, HB, Nielsen, T, Pons, N, Poulain, J, Qin, J, Sicheritz-Ponten, T, Tims, S, Torrents, D, Ugarte, E, Zoetendal, EG, Wang, J, Guarner, F, Pedersen, O, de Vos, WM, Brunak, S, Doré, J, MetaHIT Consortium (additional Members), Weissenbach, J, Ehrlich, SD and Bork, P 2011, Enterotypes of the human gut microbiome, *Nature*, 473, (7346), pp. 174–180.
- Asahara, T, Shimizu, K, Nomoto, K, Hamabata, T, Ozawa, A and Takeda, Y 2004, Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7, *Infection and Immunity*, 72, (4), pp. 2240–2247.
- Ashida, H, Ogawa, M, Kim, M, Mimuro, H and Sasakawa, C 2012, Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier, *Nature Chemical Biology*, 8, (1), pp. 36–45.
- Atuma, C, Strugala, V, Allen, A and Holm, L 2001, The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo, *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280, (5), pp. G922–G929.

В

- Bahrami, B, Child, MW, Macfarlane, S and Macfarlane, GT 2011, Adherence and cytokine induction in Caco-2 cells by bacterial populations from a three-stage continuous-culture model of the large intestine, *Applied and environmental microbiology*, 77, (9), pp. 2934–2942.
- Baker, DA 2010, Malaria gametocytogenesis, Molecular and Biochemical Parasitology, 172, (2), pp. 57-65.
- Barnett Foster, D 2013, Modulation of the enterohemorrhagic E. coli virulence program through the human gastrointestinal tract, *Virulence*, 4, (4), pp. 315–323.
- Barroso, E, Sánchez-Patán, F, Martín-Alvarez, PJ, Bartolomé, B, Moreno-Arribas, MV, Peláez, C, Requena, T, van de Wiele, T and Martínez-Cuesta, MC 2013, Lactobacillus plantarum IFPL935 favors the initial metabolism of red wine polyphenols when added to a colonic microbiota, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, (42), pp. 10163–10172.
- Barroso, E, Van de Wiele, T, Jiménez-Girón, A, Muñoz-González, I, Martín-Alvarez, PJ, Moreno-Arribas, MV, Bartolomé, B, Peláez, C, Martínez-Cuesta, MC and Requena, T 2014, Lactobacillus plantarum IFPL935 impacts colonic metabolism in a simulator of the human gut microbiota during feeding with red wine polyphenols, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, (15), pp. 6805–6815.
- Bäumler, AJ and Heffron, F 1995, Identification and sequence analysis of lpfABCDE, a putative fimbrial operon of Salmonella typhimurium., *Journal of Bacteriology*, 177, (8), pp. 2087–2097.
- Bäumler, AJ, Tsolis, RM and Heffron, F 1996, The lpf fimbrial operon mediates adhesion of Salmonella typhimurium to murine Peyer's patches, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, (1), pp. 279–283.
- Bearson, BL, Lee, IS and Casey, TA 2009, Escherichia coli O157 : H7 glutamate- and arginine-dependent acidresistance systems protect against oxidative stress during extreme acid challenge, *Microbiology (Reading, England)*, 155, (Pt 3), pp. 805–812.

- Begley, M, Gahan, CGM and Hill, C 2005, The interaction between bacteria and bile, *FEMS microbiology reviews*, 29, (4), pp. 625–651.
- Bell, BP, Griffin, PM, Lozano, P, Christie, DL, Kobayashi, JM and Tarr, PI 1997, Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections, *Pediatrics*, 100, (1), p. E12.
- Bel-Rhlid, R, Crespy, V, Page-Zoerkler, N, Nagy, K, Raab, T and Hansen, C-E 2009, Hydrolysis of rosmarinic acid from rosemary extract with esterases and Lactobacillus johnsonii in vitro and in a gastrointestinal model, *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, (17), pp. 7700–7705.
- Bel-Rhlid, R, Pagé-Zoerkler, N, Fumeaux, R, Ho-Dac, T, Chuat, J-Y, Sauvageat, JL and Raab, T 2012, Hydrolysis of chicoric and caftaric acids with esterases and Lactobacillus johnsonii in Vitro and in a gastrointestinal model, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, (36), pp. 9236–9241.
- Bergholz, TM and Whittam, TS 2007, Variation in acid resistance among enterohaemorrhagic Escherichia coli in a simulated gastric environment, *Journal of applied microbiology*, 102, (2), pp. 352–362.
- Bermudez-Brito, M, Plaza-Díaz, J, Muñoz-Quezada, S, Gómez-Llorente, C and Gil, A 2012, Probiotic Mechanisms of Action, *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61, (2), pp. 160–174.
- Bernalier-Donadille, A 2010, Activités métaboliques du microbiote intestinal humain, *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 34, (4, Supplement 1), pp. 17–23.
- Bertin, Y, Girardeau, JP, Chaucheyras-Durand, F, Lyan, B, Pujos-Guillot, E, Harel, J and Martin, C 2011, Enterohaemorrhagic Escherichia coli gains a competitive advantage by using ethanolamine as a nitrogen source in the bovine intestinal content, *Environmental Microbiology*, 13, (2), pp. 365–377.
- Besselink, MG, van Santvoort, HC, Buskens, E, Boermeester, MA, van Goor, H, Timmerman, HM, Nieuwenhuijs, VB, Bollen, TL, van Ramshorst, B, Witteman, BJ, Rosman, C, Ploeg, RJ, Brink, MA, Schaapherder, AF, Dejong, CH, Wahab, PJ, van Laarhoven, CJ, van der Harst, E, van Eijck, CH, Cuesta, MA, Akkermans, LM and Gooszen, HG 2008, Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *The Lancet*, 371, (9613), pp. 651–659.
- Beutin, L 2006, Emerging enterohaemorrhagic Escherichia coli, causes and effects of the rise of a human pathogen, Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health, 53, (7), pp. 299– 305.
- Beutin, L, Steinrück, H, Krause, G, Steege, K, Haby, S, Hultsch, G and Appel, B 2007, Comparative evaluation of the Ridascreen Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of Escherichia coli (STEC) from food and other sources, *Journal of Applied Microbiology*, 102, (3), pp. 630–639.
- Beuzón, CR and Holden, DW 2001, Use of mixed infections with Salmonella strains to study virulence genes and their interactions in vivo, *Microbes and Infection*, 3, (14–15), pp. 1345–1352.
- Bibbal, D, Loukiadis, E, Kérourédan, M, Ferré, F, Dilasser, F, Peytavin de Garam, C, Cartier, P, Oswald, E, Gay, E, Auvray, F and Brugère, H 2015, Prevalence of Carriage of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among Slaughtered Adult Cattle in France, *Applied and Environmental Microbiology*, 81, (4), pp. 1397–1405.
- Bik, EM, Eckburg, PB, Gill, SR, Nelson, KE, Purdom, EA, Francois, F, Perez-Perez, G, Blaser, MJ and Relman, DA 2006, Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, (3), pp. 732–737.
- Bitzan, M 2009, Treatment options for HUS secondary to Escherichia coli O157:H7, *Kidney International. Supplement*, (112), pp. S62–66.
- Blanquet-Diot, S, Denis, S, Chalancon, S, Chaira, F, Cardot, J-M and Alric, M 2012, Use of artificial digestive systems to investigate the biopharmaceutical factors influencing the survival of probiotic yeast during gastrointestinal transit in humans, *Pharmaceutical research*, 29, (6), pp. 1444–1453.
- Blanquet-Diot, S, Soufi, M, Rambeau, M, Rock, E and Alric, M 2009, Digestive stability of xanthophylls exceeds that of carotenes as studied in a dynamic in vitro gastrointestinal system, *The Journal of nutrition*, 139, (5), pp. 876–883.
- Blanquet, S, Meunier, JP, Minekus, M, Marol-Bonnin, S and Alric, M 2003, Recombinant Saccharomyces cerevisiae expressing P450 in artificial digestive systems: a model for biodetoxication in the human digestive environment, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, (5), pp. 2884–2892.

- Blanquet, S, Zeijdner, E, Beyssac, E, Meunier, J-P, Denis, S, Havenaar, R and Alric, M 2004, A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions, *Pharmaceutical Research*, 21, (4), pp. 585–591.
- Boerlin, P, McEwen, SA, Boerlin-Petzold, F, Wilson, JB, Johnson, RP and Gyles, CL 1999, Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing Escherichia coli and disease in humans, *Journal of Clinical Microbiology*, 37, (3), pp. 497–503.
- Bolca, S and Verstraete, W 2010, Microbial equol production attenuates colonic methanogenesis and sulphidogenesis in vitro, *Anaerobe*, 16, (3), pp. 247–252.
- Bouix, M and Ghorbal, S 2015, Rapid assessment of Oenococcus oeni activity by measuring intracellular pH and membrane potential by flow cytometry, and its application to the more effective control of malolactic fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, 193, pp. 139–146.
- Branchu, P, Matrat, S, Vareille, M, Garrivier, A, Durand, A, Crépin, S, Harel, J, Jubelin, G and Gobert, AP 2014, NsrR, GadE, and GadX interplay in repressing expression of the Escherichia coli O157:H7 LEE pathogenicity island in response to nitric oxide, *PLoS pathogens*, 10, (1), p. e1003874.
- Brashears, MM, Galyean, ML, Loneragan, GH, Mann, JE and Killinger-Mann, K 2003, Prevalence of Escherichia coli O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given Lactobacillus direct-fed microbials, *Journal of Food Protection*, 66, (5), pp. 748–754.
- Brashears, MM, Jaroni, D and Trimble, J 2003, Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of Escherichia coli O157:H7 in cattle, *Journal of Food Protection*, 66, (3), pp. 355–363.
- Brigotti, M, Tazzari, PL, Ravanelli, E, Carnicelli, D, Rocchi, L, Arfilli, V, Scavia, G, Minelli, F, Ricci, F, Pagliaro, P, Ferretti, AVS, Pecoraro, C, Paglialonga, F, Edefonti, A, Procaccino, MA, Tozzi, AE and Caprioli, A 2011, Clinical relevance of shiga toxin concentrations in the blood of patients with hemolytic uremic syndrome, *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 30, (6), pp. 486–490.
- Bron, PA, Marco, M, Hoffer, SM, Mullekom, EV, Vos, WM de and Kleerebezem, M 2004, Genetic Characterization of the Bile Salt Response in Lactobacillus plantarum and Analysis of Responsive Promoters In Vitro and In Situ in the Gastrointestinal Tract, *Journal of Bacteriology*, 186, (23), pp. 7829– 7835.
- Brouwers, J, Anneveld, B, Goudappel, G-J, Duchateau, G, Annaert, P, Augustijns, P and Zeijdner, E 2011, Fooddependent disintegration of immediate release fosamprenavir tablets: in vitro evaluation using magnetic resonance imaging and a dynamic gastrointestinal system, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 77, (2), pp. 313–319.
- Brugère, H, Auvray, F, Mariani-Kurkdjian, P and King, LA 2012, E. coli producteurs de shigatoxines (STEC): définitions, virulence et propriétés des souches entérohémorragiques (EHEC), Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire (BEH) du 9 mai 2012 - Hors-série Risques microbiologiques alimentaires dans les produits d'origine animale surveillance et évaluation, pp. 20–25.
- Bruyand, M, Mariani-Kurkdjian, P, Gouali, M, Van Cauteren, D, de Valk, H and le réseau des néphrologues pédiatres n.d., Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2014.
- Bulet, P, Stöcklin, R and Menin, L 2004, Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates, *Immunological Reviews*, 198, (1), pp. 169–184.
- Burland, V, Shao, Y, Perna, NT, Plunkett, G, Sofia, HJ and Blattner, FR 1998, The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of Escherichia coli O157:H7., *Nucleic Acids Research*, 26, (18), pp. 4196–4204.

С

Cadona, JS, Bustamante, AV, Parma, AE, Lucchesi, PMA and Sanso, AM 2013, Distribution of additional virulence factors related to adhesion and toxicity in Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from raw products in Argentina, *Letters in Applied Microbiology*, 56, (6), pp. 449–455.

- Calderwood, SB and Mekalanos, JJ 1987, Iron regulation of Shiga-like toxin expression in Escherichia coli is mediated by the fur locus, *Journal of Bacteriology*, 169, (10), pp. 4759–4764.
- Callaway, TR, Stahl, CH, Edrington, TS, Genovese, KJ, Lincoln, LM, Anderson, RC, Lonergan, SM, Poole, TL, Harvey, RB and Nisbet, DJ 2004, Colicin concentrations inhibit growth of Escherichia coli O157:H7 in vitro, *Journal of Food Protection*, 67, (11), pp. 2603–2607.
- Callister, SJ, McCue, LA, Turse, JE, Monroe, ME, Auberry, KJ, Smith, RD, Adkins, JN and Lipton, MS 2008, Comparative Bacterial Proteomics: Analysis of the Core Genome Concept, *PLoS ONE*, 3, (2).
- Carey, CM, Kostrzynska, M, Ojha, S and Thompson, S 2008, The effect of probiotics and organic acids on Shigatoxin 2 gene expression in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7, *Journal of Microbiological Methods*, 73, (2), pp. 125–132.
- Carney, E, O'Brien, SB, Sheridan, JJ, McDowell, DA, Blair, IS and Duffy, G 2006, Prevalence and level of Escherichia coli O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant, *Food Microbiology*, 23, (1), pp. 52–59.
- Carter, MQ, Louie, JW, Fagerquist, CK, Sultan, O, Miller, WG and Mandrell, RE 2012, Evolutionary silence of the acid chaperone protein HdeB in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7, *Applied and Environmental Microbiology*, 78, (4), pp. 1004–1014.
- Caselli, M, Cassol, F, Calò, G, Holton, J, Zuliani, G and Gasbarrini, A 2013, Actual concept of 'probiotics': Is it more functional to science or business?, *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 19, (10), pp. 1527–1540.
- Cave, MR, Wragg, J, Harrison, I, Vane, CH, Wiele, TV de, Groeve, ED, Nathanail, CP, Ashmore, M, Thomas, R, Robinson, J and Daly, P 2010, Comparison of batch mode and dynamic physiologically based bioaccessibility tests for PAHs in soil samples, *Environmental Science & Technology*, 44, (7), pp. 2654– 2660.
- Cegelski, L, Pinkner, JS, Hammer, ND, Cusumano, CK, Hung, CS, Chorell, E, Aberg, V, Walker, JN, Seed, PC, Almqvist, F, Chapman, MR and Hultgren, SJ 2009, Small-molecule inhibitors target Escherichia coli amyloid biogenesis and biofilm formation, *Nature Chemical Biology*, 5, (12), pp. 913–919.
- Cerf-Bensussan, N and Gaboriau-Routhiau, V 2010, The immune system and the gut microbiota: friends or foes?, *Nature Reviews Immunology*, 10, (10), pp. 735–744.
- Ceuppens, S, Boon, N, Rajkovic, A, Heyndrickx, M, Van de Wiele, T and Uyttendaele, M 2010, Quantification methods for Bacillus cereus vegetative cells and spores in the gastrointestinal environment, *Journal of Microbiological Methods*, 83, (2), pp. 202–210.
- Ceuppens, S, Rajkovic, A, Hamelink, S, Van de Wiele, T, Boon, N and Uyttendaele, M 2012, Enterotoxin production by Bacillus cereus under gastrointestinal conditions and their immunological detection by commercially available kits, *Foodborne Pathogens and Disease*, 9, (12), pp. 1130–1136.
- Ceuppens, S, Uyttendaele, M, Drieskens, K, Heyndrickx, M, Rajkovic, A, Boon, N and Van de Wiele, T 2012, Survival and germination of Bacillus cereus spores without outgrowth or enterotoxin production during in vitro simulation of gastrointestinal transit, *Applied and Environmental Microbiology*, 78, (21), pp. 7698–7705.
- Ceuppens, S, Van de Wiele, T, Rajkovic, A, Ferrer-Cabaceran, T, Heyndrickx, M, Boon, N and Uyttendaele, M 2012, Impact of intestinal microbiota and gastrointestinal conditions on the in vitro survival and growth of Bacillus cereus, *International Journal of Food Microbiology*, 155, (3), pp. 241–246.
- Chassaing, B, Etienne-Mesmin, L, Bonnet, R and Darfeuille-Michaud, A 2013, Bile salts induce long polar fimbriae expression favouring Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli interaction with Peyer's patches, *Environmental Microbiology*, 15, (2), pp. 355–371.
- Chassaing, B, Rolhion, N, de Vallée, A, Salim, SY, Prorok-Hamon, M, Neut, C, Campbell, BJ, Söderholm, JD, Hugot, J-P, Colombel, J-F and Darfeuille-Michaud, A 2011, Crohn disease–associated adherent-invasive E. coli bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae, *The Journal of Clinical Investigation*, 121, (3), pp. 966–975.
- Chaucheyras-Durand, F and Durand, H 2010, Probiotics in animal nutrition and health, *Beneficial Microbes*, 1, (1), pp. 3–9.

- Chekabab, SM, Daigle, F, Charette, SJ, Dozois, CM and Harel, J 2012, Survival of enterohemorrhagic Escherichia coli in the presence of Acanthamoeba castellanii and its dependence on Pho regulon, *MicrobiologyOpen*, 1, (4), pp. 427–437.
- Chen, H, Ouyang, W, Martoni, C, Afkhami, F, Lawuyi, B, Lim, T and Prakash, S 2010, Investigation of Genipin Cross-Linked Microcapsule for Oral Delivery of Live Bacterial Cells and Other Biotherapeutics: Preparation and In Vitro Analysis in Simulated Human Gastrointestinal Model, *International Journal of Polymer Science*, 2010, p. e985137.
- Chen, J, Gaikwad, V, Holmes, M, Murray, B, Povey, M, Wang, Y and Zhang, Y 2011, Development of a simple model device for in vitro gastric digestion investigation, *Food & function*, 2, (3-4), pp. 174–182.
- Chen, L, Hébrard, G, Beyssac, E, Denis, S and Subirade, M 2010, In vitro study of the release properties of soyzein protein microspheres with a dynamic artificial digestive system, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, (17), pp. 9861–9867.
- Chen, L-S, Ma, Y, Maubois, J-L, He, S-H, Chen, L-J and Li, H-M 2010, Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol, *Dairy Science & Technology*, 90, (5), pp. 537–548.
- Chingcuanco, F, Yu, Y, Kus, JV, Que, L, Lackraj, T, Lévesque, CM and Barnett Foster, D 2012, Identification of a novel adhesin involved in acid-induced adhesion of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157 : H7, *Microbiology (Reading, England)*, 158, (Pt 9), pp. 2399–2407.
- Cho, I and Blaser, MJ 2012, The Human Microbiome: at the interface of health and disease, *Nature reviews*. *Genetics*, 13, (4), pp. 260–270.
- Chong, Y, Fitzhenry, R, Heuschkel, R, Torrente, F, Frankel, G and Phillips, AD 2007, Human intestinal tissue tropism in Escherichia coli O157 : H7 initial colonization of terminal ileum and Peyer's patches and minimal colonic adhesion ex vivo, *Microbiology*, 153, (3), pp. 794–802.
- Chung, H j., Bang, W and Drake, M a. 2006, Stress Response of Escherichia coli, *Comprehensive Reviews in Food* Science and Food Safety, 5, (3), pp. 52–64.
- Cimolai, N, Morrison, BJ and Carter, JE 1992, Risk factors for the central nervous system manifestations of gastroenteritis-associated hemolytic-uremic syndrome, *Pediatrics*, 90, (4), pp. 616–621.
- Cinquin, C, Le Blay, G, Fliss, I and Lacroix, C 2004, Immobilization of infant fecal microbiota and utilization in an in vitro colonic fermentation model, *Microbial ecology*, 48, (1), pp. 128–138.
- Clevers, H 2013, The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment, Cell, 154, (2), pp. 274–284.
- Collignon, A and Butel, MJ 2004, Établissement et composition de la flore microbienne intestinale, *Flore microbienne intestinale: physiologie et pathologie digestives (Rambaud JC, Buts JP, Corthier G, Flourié B, eds) pp*, pp. 19–35.
- Combrisson, H 2014, La directive 2010/63/UE: l'explicite et l'implicite, *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 167, (2), pp. 137–142.
- Comitini, F, Mannazzu, I and Ciani, M 2009, Tetrapisispora phaffii killer toxin is a highly specific β-glucanase that disrupts the integrity of the yeast cell wall, *Microbial Cell Factories*, 8, p. 55.
- Connolly, JPR, Finlay, BB and Roe, AJ 2015, From ingestion to colonization: the influence of the host environment on regulation of the LEE encoded type III secretion system in enterohaemorrhagic Escherichia coli, *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Connolly, JPR, Goldstone, RJ, Burgess, K, Cogdell, RJ, Beatson, SA, Vollmer, W, Smith, DGE and Roe, AJ 2015, The host metabolite D-serine contributes to bacterial niche specificity through gene selection, *The ISME journal*, 9, (4), p. 1052.
- Corr, SC, Gahan, CCGM and Hill, C 2008, M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52, (1), pp. 2–12.
- Croxen, MA, Law, RJ, Scholz, R, Keeney, KM, Wlodarska, M and Finlay, BB 2013, Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli, *Clinical Microbiology Reviews*, 26, (4), pp. 822–880.
- Cummings, JH, Pomare, EW, Branch, WJ, Naylor, CP and Macfarlane, GT 1987, Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood., *Gut*, 28, (10), pp. 1221–1227.

- Curtis, MM, Hu, Z, Klimko, C, Narayanan, S, Deberardinis, R and Sperandio, V 2014, The gut commensal Bacteroides thetaiotaomicron exacerbates enteric infection through modification of the metabolic landscape, *Cell Host & Microbe*, 16, (6), pp. 759–769.
- Czerucka, D, Piche, T and Rampal, P 2007, Review article: yeast as probiotics -- Saccharomyces boulardii, *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 26, (6), pp. 767–778.

${\cal D}$

- Dahan, S, Dalmasso, G, Imbert, V, Peyron, J-F, Rampal, P and Czerucka, D 2003, Saccharomyces boulardii interferes with enterohemorrhagic Escherichia coli-induced signaling pathways in T84 cells, *Infection and immunity*, 71, (2), pp. 766–773.
- Dalmasso, G, Loubat, A, Dahan, S, Calle, G, Rampal, P and Czerucka, D 2006, Saccharomyces boulardii prevents TNF-α-induced apoptosis in EHEC-infected T84 cells, *Research in Microbiology*, 157, (5), pp. 456–465.
- Dave, M, Higgins, PD, Middha, S and Rioux, KP 2012, The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions, *Translational Research*, 160, (4), pp. 246–257.
- Déat, E, Blanquet-Diot, S, Jarrige, J-F, Denis, S, Beyssac, E and Alric, M 2009, Combining the dynamic TNOgastrointestinal tract system with a Caco-2 cell culture model: Application to the assessment of lycopene and α-tocopherol bioavailability from a whole food, *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, (23), pp. 11314–11320.
- Desreumaux, P, Neut, C, Cazaubiel, M, Matthieu, P, Fanny, P and Peter, J 2011, Saccharomyces cerevisiae CNCM I-3856 reduces digestive discomfort and abdominal pain in subjects with irritable bowel syndrome: a randomized double-blinded placebo-controlled clinical trial, *Gastroenterology*, 140, (5), p. S–50.
- De Weirdt, R, Coenen, E, Vlaeminck, B, Fievez, V, Van den Abbeele, P and Van de Wiele, T 2013, A simulated mucus layer protects Lactobacillus reuteri from the inhibitory effects of linoleic acid, *Beneficial Microbes*, 4, (4), pp. 299–312.
- De Weirdt, R, Possemiers, S, Vermeulen, G, Moerdijk-Poortvliet, TCW, Boschker, HTS, Verstraete, W and Van de Wiele, T 2010, Human faecal microbiota display variable patterns of glycerol metabolism, *FEMS microbiology ecology*, 74, (3), pp. 601–611.
- Diaz-Bone, RA and van de Wiele, TR 2009, Biovolatilization of metal(loid)s by intestinal microorganisms in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem, *Environmental Science & Technology*, 43, (14), pp. 5249–5256.
- Dickinson, PA, Abu Rmaileh, R, Ashworth, L, Barker, RA, Burke, WM, Patterson, CM, Stainforth, N and Yasin, M 2012, An investigation into the utility of a multi-compartmental, dynamic, system of the upper gastrointestinal tract to support formulation development and establish bioequivalence of poorly soluble drugs, *The AAPS journal*, 14, (2), pp. 196–205.
- Domoto, N, Koenen, ME, Havenaar, R, Mikajiri, A and Chu, B-S 2013, The bioaccessibility of eicosapentaenoic acid was higher from phospholipid food products than from mono- and triacylglycerol food products in a dynamic gastrointestinal model, *Food Science & Nutrition*, 1, (6), pp. 409–415.
- van Dorsten, FA, Peters, S, Gross, G, Gomez-Roldan, V, Klinkenberg, M, de Vos, RC, Vaughan, EE, van Duynhoven, JP, Possemiers, S, van de Wiele, T and Jacobs, DM 2012, Gut Microbial Metabolism of Polyphenols from Black Tea and Red Wine/Grape Juice Is Source-Specific and Colon-Region Dependent, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, (45), pp. 11331–11342.
- Dostal, A, Gagnon, M, Chassard, C, Zimmermann, MB, O'Mahony, L and Lacroix, C 2014, Salmonella adhesion, invasion and cellular immune responses are differentially affected by iron concentrations in a combined in vitro gut fermentation-cell model, *PloS one*, 9, (3).
- Doughty, S, Sloan, J, Bennett-Wood, V, Robertson, M, Robins-Browne, RM and Hartland, EL 2002, Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic Escherichia coli, *Infection and Immunity*, 70, (12), pp. 6761–6769.
- Duerkop, BA, Vaishnava, S and Hooper, LV 2009, Immune Responses to the Microbiota at the Intestinal Mucosal Surface, *Immunity*, 31, (3), pp. 368–376.

Dunne, C, O'Mahony, L, Murphy, L, Thornton, G, Morrissey, D, O'Halloran, S, Feeney, M, Flynn, S, Fitzgerald, G, Daly, C, Kiely, B, O'Sullivan, GC, Shanahan, F and Collins, JK 2001, In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, (2), p. 386s–392s.

E

- Eckburg, PB, Bik, EM, Bernstein, CN, Purdom, E, Dethlefsen, L, Sargent, M, Gill, SR, Nelson, KE and Relman, DA 2005, Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora, *Science*, 308, (5728), pp. 1635–1638.
- Effler, E, Isaäcson, M, Arntzen, L, Heenan, R, Canter, P, Barrett, T, Lee, L, Mambo, C, Levine, W, Zaidi, A and Griffin, PM 2001, Factors contributing to the emergence of Escherichia coli O157 in Africa, *Emerging Infectious Diseases*, 7, (5), pp. 812–819.
- EFSA 2013, The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012, *EFSa Journal*, 11, (4), pp. 1–250.
- Elashoff, JD, Reedy, TJ, Meyer, JH and others 1982, Analysis of gastric emptying data, *Gastroenterology*, 83, (6), pp. 1306–1312.
- van Elsas, JD, Semenov, AV, Costa, R and Trevors, JT 2011, Survival of Escherichia coli in the environment: fundamental and public health aspects, *The ISME journal*, 5, (2), pp. 173–183.
- Englyst, HN, Kingman, SM, Hudson, GJ and Cummings, JH 1996, Measurement of resistant starch in vitro and in vivo, *British Journal of Nutrition*, 75, (05), pp. 749–755.
- Espié, E, Grimont, F, Mariani-Kurkidjan, P, Vaillant et le réseau des néphrologues pédiatres, V and le réseau des néphrologues pédiatres 2006, Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2005, *InVS*, pp. 1–3.
- Espié, E, Mariani-Kurkdjian, P, Filliol, I, Vaillant, V and de Valk, H 2008, Infections humaines à E. coli producteurs de Shiga-toxines en France: aspects cliniques, diagnostiques et épidémiologiques, *Revue Francophone des Laboratoires*, 2008, (400), pp. 59–65.
- Etienne-Mesmin, L, Chassaing, B, Sauvanet, P, Denizot, J, Blanquet-Diot, S, Darfeuille-Michaud, A, Pradel, N and Livrelli, V 2011, Interactions with M cells and macrophages as key steps in the pathogenesis of enterohemorrhagic Escherichia coli infections, *PloS one*, 6, (8), p. e23594.
- Etienne-Mesmin, L, Livrelli, V, Privat, M, Denis, S, Cardot, J-M, Alric, M and Blanquet-Diot, S 2011, Effect of a new probiotic Saccharomyces cerevisiae strain on survival of Escherichia coli O157:H7 in a dynamic gastrointestinal model, *Applied and environmental microbiology*, 77, (3), pp. 1127–1131.
- Everard, A, Matamoros, S, Geurts, L, Delzenne, NM and Cani, PD 2014, Saccharomyces boulardii administration changes gut microbiota and reduces hepatic steatosis, low-grade inflammation, and fat mass in obese and type 2 diabetic db/db mice, *mBio*, 5, (3), pp. e01011–01014.

${\mathcal F}$

- Fach, P, Grimont, F, Mariani-Kurkdjian, P and Vernozy-Rozand, C 2003, « Isolement et Identification des STEC », Dans : Bilan des connaissances relatives aux Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines (STEC). Sous la dir. de C. Vernozy-Rozand et S. Roze., Afssa, pp. 106–120.
- Fallingborg, J, Pedersen, P and Jacobsen, BA 1998, Small Intestinal Transit Time and Intraluminal pH in Ileocecal Resected Patients with Crohn's Disease, Digestive Diseases and Sciences, 43, (4), pp. 702–705.
- FAO/WHO 2002, Report of a joint FAO/WHO working group on drafture Organization of the United Nations and World Health Organization, London, Otario, Canada.
- Fardet, A, Souchon, I and Dupont, D 2013, Structure des aliments et effets nutritionnels, Editions Quae.

- Farfan, MJ, Cantero, L, Vergara, A, Vidal, R and Torres, AG 2013, The long polar fimbriae of STEC O157:H7 induce expression of pro-inflammatory markers by intestinal epithelial cells, Veterinary Immunology and Immunopathology, 152, (1-2), pp. 126–131.
- Farfan, MJ, Cantero, L, Vidal, R, Botkin, DJ and Torres, AG 2011, Long Polar Fimbriae of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 Bind to Extracellular Matrix Proteins, Infection and Immunity, 79, (9), pp. 3744–3750.
- Ferens, WA and Hovde, CJ 2011, Escherichia coli O157:H7: Animal Reservoir and Sources of Human Infection, Foodborne Pathogens and Disease, 8, (4), pp. 465–487.
- Feria-Gervasio, D, Tottey, W, Gaci, N, Alric, M, Cardot, J-M, Peyret, P, Martin, J-F, Pujos, E, Sébédio, J-L and Brugère, J-F 2014, Three-stage continuous culture system with a self-generated anaerobia to study the regionalized metabolism of the human gut microbiota, Journal of microbiological methods, 96, pp. 111–118.
- Fernandez, B, Hammami, R, Savard, P, Jean, J and Fliss, I 2014, Pediococcus acidilactici UL5 and Lactococcus lactis ATCC 11454 are able to survive and express their bacteriocin genes under simulated gastrointestinal conditions, Journal of Applied Microbiology, 116, (3), pp. 677–688.
- Fialho, MB, Toffano, L, Pedroso, MP, Augusto, F and Pascholati, SF 2009, Volatile organic compounds produced by Saccharomyces cerevisiae inhibit the in vitro development of Guignardia citricarpa, the causal agent of citrus black spot, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26, (5), pp. 925–932.
- Fitzhenry, R, Dahan, S, Torres, AG, Chong, Y, Heuschkel, R, Murch, SH, Thomson, M, Kaper, JB, Frankel, G and Phillips, AD 2006, Long polar fimbriae and tissue tropism in Escherichia coli O157:H7, Microbes and Infection, 8, (7), pp. 1741–1749.
- van der Flier, LG and Clevers, H 2009, Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium, Annual Review of Physiology, 71, pp. 241–260.
- Foligné, B, Daniel, C and Pot, B 2013, Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges, Current Opinion in Microbiology, 16, (3), pp. 284–292.
- Foligné, B, Dewulf, J, Vandekerckove, P, Pignède, G and Pot, B 2010, Probiotic yeasts: Anti-inflammatory potential of various non-pathogenic strains in experimental colitis in mice, World Journal of Gastroenterology: WJG, 16, (17), pp. 2134–2145.
- Foster, JW 2004, Escherichia coli acid resistance: tales of an amateur acidophile, Nature Reviews. Microbiology, 2, (11), pp. 898–907.
- Fraher, MH, O'Toole, PW and Quigley, EM 2012, Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician, Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 9, (6), pp. 312–322.
- Frankel, G, Phillips, AD, Rosenshine, I, Dougan, G, Kaper, JB and Knutton, S 1998, Enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli: more subversive elements, Molecular Microbiology, 30, (5), pp. 911–921.
- Frank, N, Dubois, M, Scholz, G, Seefelder, W, Chuat, J-Y and Schilter, B 2013, Application of gastrointestinal modelling to the study of the digestion and transformation of dietary glycidyl esters, Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 30, (1), pp. 69–79.
- Friedrich, AW, Bielaszewska, M, Zhang, W-L, Pulz, M, Kuczius, T, Ammon, A and Karch, H 2002, Escherichia coli harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms, The Journal of Infectious Diseases, 185, (1), pp. 74–84.
- Fukuda, S, Toh, H, Hase, K, Oshima, K, Nakanishi, Y, Yoshimura, K, Tobe, T, Clarke, JM, Topping, DL, Suzuki, T, Taylor, TD, Itoh, K, Kikuchi, J, Morita, H, Hattori, M and Ohno, H 2011, Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate, Nature, 469, (7331), pp. 543–547.
- Fukuda, S, Toh, H, Taylor, TD, Ohno, H and Hattori, M 2012, Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters, Gut microbes, 3, (5), pp. 449–454.

G

- Gamage, SD, Patton, AK, Strasser, JE, Chalk, CL and Weiss, AA 2006, Commensal bacteria influence Escherichia coli O157:H7 persistence and Shiga toxin production in the mouse intestine, *Infection and Immunity*, 74, (3), pp. 1977–1983.
- Gamage, SD, Strasser, JE, Chalk, CL and Weiss, AA 2003, Nonpathogenic Escherichia coli can contribute to the production of Shiga toxin, *Infection and Immunity*, 71, (6), pp. 3107–3115.
- Ganong, W 2005, Physiologie médicale, De Boeck Supérieur.
- Garmendia, J, Frankel, G and Crepin, VF 2005, Enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli infections: translocation, translocation, *Infection and Immunity*, 73, (5), pp. 2573–2585.
- Garrett, DA, Failla, ML and Sarama, RJ 1999, Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals, *Journal of agricultural and food chemistry*, 47, (10), pp. 4301–4309.
- Gedek, BR 1999, Adherence of Escherichia coli serogroup O 157 and the Salmonella typhimurium mutant DT 104 to the surface of Saccharomyces boulardii, *Mycoses*, 42, (4), pp. 261–264.
- Geirnaert, A, Steyaert, A, Eeckhaut, V, Debruyne, B, Arends, JBA, Van Immerseel, F, Boon, N and Van de Wiele, T 2014, Butyricicoccus pullicaecorum, a butyrate producer with probiotic potential, is intrinsically tolerant to stomach and small intestine conditions, *Anaerobe*, 30, pp. 70–74.
- Geirnaert, A, Wang, J, Tinck, M, Steyaert, A, Van den Abbeele, P, Eeckhaut, V, Vilchez-Vargas, R, Falony, G, Laukens, D, De Vos, M, Van Immerseel, F, Raes, J, Boon, N and Van de Wiele, T 2015, Interindividual differences in response to treatment with butyrate-producing Butyricicoccus pullicaecorum 25-3T studied in an in vitro gut model, *FEMS microbiology ecology*, 91, (6).
- Gérard-Champod, M, Blanquet-Diot, S, Cardot, J-M, Bravo, D and Alric, M 2010, Development and validation of a continuous in vitro system reproducing some biotic and abiotic factors of the veal calf intestine, *Applied and environmental microbiology*, 76, (16), pp. 5592–5600.
- Gérard, P and Bernalier-Donadille, A 2007, Les fonctions majeures du microbiote intestinal, *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42, pp. 28–36.
- Gervais, R, Gagnon, F, Kheadr, EE, Van Calsteren, M-R, Farnworth, ER, Fliss, I and Chouinard, PY 2009, Bioaccessibility of fatty acids from conjugated linoleic acid-enriched milk and milk emulsions studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model, *International dairy journal*, 19, (10), pp. 574–581.
- Gibson, GR, Cummings, JH and Macfarlane, GT 1988, Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria., *Applied and environmental microbiology*, 54, (11), pp. 2750–2755.
- Gillespie, IA, O'Brien, SJ, Adak, GK, Cheasty, T and Willshaw, G 2005, Foodborne general outbreaks of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157 in England and Wales 1992-2002: where are the risks?, *Epidemiology and Infection*, 133, (5), pp. 803–808.
- Girardeau, JP, Dalmasso, A, Bertin, Y, Ducrot, C, Bord, S, Livrelli, V, Vernozy-Rozand, C and Martin, C 2005, Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates, *Journal of Clinical Microbiology*, 43, (12), pp. 6098–6107.
- Goldwater, PN and Bettelheim, KA 2012, Treatment of enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) infection and hemolytic uremic syndrome (HUS), *BMC medicine*, 10, p. 12.
- Gonyar, LA and Kendall, MM 2014, Ethanolamine and choline promote expression of putative and characterized fimbriae in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7, *Infection and Immunity*, 82, (1), pp. 193–201.
- Gouali, M and Weill, F-X 2013, Les Escherichia coli entérohémorragiques : des entérobactéries d'actualité, *La Presse Médicale*, 42, (1), pp. 68–75.
- Grootaert, C, Boon, N, Zeka, F, Vanhoecke, B, Bracke, M, Verstraete, W and Van de Wiele, T 2011, Adherence and viability of intestinal bacteria to differentiated Caco-2 cells quantified by flow cytometry, *Journal of Microbiological Methods*, 86, (1), pp. 33–41.

- Grootaert, C, Van den Abbeele, P, Marzorati, M, Broekaert, WF, Courtin, CM, Delcour, JA, Verstraete, W and Van de Wiele, T 2009, Comparison of prebiotic effects of arabinoxylan oligosaccharides and inulin in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem, *FEMS microbiology ecology*, 69, (2), pp. 231–242.
- Gropper, S and Smith, J 2012, Advanced Nutrition and Human Metabolism, Cengage Learning.
- Guandalini, S 2011, Probiotics for Prevention and Treatment of Diarrhea:, *Journal of Clinical Gastroenterology*, 45, pp. S149–S153.
- Guerra, A, Etienne-Mesmin, L, Livrelli, V, Denis, S, Blanquet-Diot, S and Alric, M 2012, Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion, *Trends in biotechnology*, 30, (11), pp. 591–600.
- Guillard, T, Limelette, A, Le Magrex-Debar, E, Wynckel, A, Gouali, M, Mariani-Kurkdjian, P, Guyot-Colosio, C and de Champs, C 2015, Fatal case of hemolytic-uremic syndrome in an adult due to a rare serogroup O91 Entero hemorrhagic Escherichia coli associated with a Clostridium difficile infection. More than meets the eye, *International Journal of Infectious Diseases*, 37, pp. 113–114.
- Gun, H, Yilmaz, A, Turker, S, Tanlasi, A and Yilmaz, H 2003, Contamination of bovine carcasses and abattoir environment by Escherichia coli O157:H7 in Istanbul, *International Journal of Food Microbiology*, 84, (3), pp. 339–344.
- Guyon, R, Dorey, F, Malas, JP, Grimont, F, Foret, J, Rouvière, B and Collobert, JF 2001, Superficial contamination of bovine carcasses by Escherichia coli O157:H7 in a slaughterhouse in Normandy (France), *Meat Science*, 58, (3), pp. 329–331.

${\mathcal H}$

- Hammar, M», Arnqvist, A, Bian, Z, Olsén, A and Normark, S 1995, Expression of two csg operons is required for production of fibronectin- and Congo red-binding curli polymers in Escherichia coli K-12, *Molecular Microbiology*, 18, (4), pp. 661–670.
- Hamner, S, McInnerney, K, Williamson, K, Franklin, MJ and Ford, TE 2013, Bile salts affect expression of Escherichia coli O157:H7 genes for virulence and iron acquisition, and promote growth under iron limiting conditions, *PloS One*, 8, (9), p. e74647.
- Hase, K, Kawano, K, Nochi, T, Pontes, GS, Fukuda, S, Ebisawa, M, Kadokura, K, Tobe, T, Fujimura, Y, Kawano, S, Yabashi, A, Waguri, S, Nakato, G, Kimura, S, Murakami, T, Iimura, M, Hamura, K, Fukuoka, S-I, Lowe, AW, Itoh, K, Kiyono, H and Ohno, H 2009, Uptake through glycoprotein 2 of FimH+ bacteria by M cells initiates mucosal immune response, *Nature*, 462, (7270), pp. 226–230.
- Hatanaka, M, Nakamura, Y, Maathuis, AJH, Venema, K, Murota, I and Yamamoto, N 2012, Influence of Bacillus subtilis C-3102 on microbiota in a dynamic in vitro model of the gastrointestinal tract simulating human conditions, *Beneficial Microbes*, 3, (3), pp. 229–236.
- Hatoum, R, Labrie, S and Fliss, I 2012, Antimicrobial and Probiotic Properties of Yeasts: From Fundamental to Novel Applications, *Frontiers in Microbiology*, 3.
- Havenaar, R, de Jong, A, Koenen, ME, van Bilsen, J, Janssen, AM, Labij, E and Westerbeek, HJM 2013, Digestibility of transglutaminase cross-linked caseinate versus native caseinate in an in vitro multicompartmental model simulating young child and adult gastrointestinal conditions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, (31), pp. 7636–7644.
- Hayashi, H, Takahashi, R, Nishi, T, Sakamoto, M and Benno, Y 2005, Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism, *Journal of medical microbiology*, 54, (11), pp. 1093–1101.
- Hébrard, G, Hoffart, V, Cardot, J-M, Subirade, M, Alric, M and Beyssac, E 2009, Investigation of coated whey protein/alginate beads as sustained release dosage form in simulated gastrointestinal environment, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35, (9), pp. 1103–1112.
- Hedenström, M, Emtenäs, H, Pemberton, N, Aberg, V, Hultgren, SJ, Pinkner, JS, Tegman, V, Almqvist, F, Sethson, I and Kihlberg, J 2005, NMR studies of interactions between periplasmic chaperones from

uropathogenic E. coli and pilicides that interfere with chaperone function and pilus assembly, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3, (23), pp. 4193–4200.

- Helbig, A, Silletti, E, Aken, GA van, Oosterveld, A, Minekus, M, Hamer, RJ and Gruppen, H 2012, Lipid Digestion of Protein Stabilized Emulsions Investigated in a Dynamic In Vitro Gastro-Intestinal Model System, *Food Digestion*, 4, (2-3), pp. 58–68.
- Helou, C, Denis, S, Spatz, M, Marier, D, Rame, V, Alric, M, Tessier, FJ and Gadonna-Widehem, P 2015, Insights into bread melanoidins: fate in the upper digestive tract and impact on the gut microbiota using in vitro systems, *Food & Function*.
- Hemery, YM, Anson, NM, Havenaar, R, Haenen, GR, Noort, MW and Rouau, X 2010, Dry-fractionation of wheat bran increases the bioaccessibility of phenolic acids in breads made from processed bran fractions, *Food Research International*, 43, (5), pp. 1429–1438.
- Hill, C, Guarner, F, Reid, G, Gibson, GR, Merenstein, DJ, Pot, B, Morelli, L, Canani, RB, Flint, HJ, Salminen, S, Calder, PC and Sanders, ME 2014, Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic, *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 11, (8), pp. 506–514.
- Hoebler, C, Lecannu, G, Belleville, C, Devaux, M-F, Popineau, Y and Barry, J-L 2002, Development of an in vitro system simulating bucco-gastric digestion to assess the physical and chemical changes of food, *International journal of food sciences and nutrition*, 53, (5), pp. 389–402.
- Hoffmann, DE 2013, Health claim regulation of probiotics in the USA and the EU: is there a middle way?, *Beneficial Microbes*, 4, (1), pp. 109–115.
- Hofmann, AF 1999, The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease, *Archives of Internal Medicine*, 159, (22), pp. 2647–2658.
- Hong, W, Wu, YE, Fu, X and Chang, Z 2012, Chaperone-dependent mechanisms for acid resistance in enteric bacteria, *Trends in Microbiology*, 20, (7), pp. 328–335.
- Ho, NK, Henry, AC, Johnson-Henry, K and Sherman, PM 2013, Pathogenicity, host responses and implications for management of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 infection, *Canadian Journal of Gastroenterology = Journal Canadien De Gastroenterologie*, 27, (5), pp. 281–285.
- Hooper, LV 2004, Bacterial contributions to mammalian gut development, *Trends in Microbiology*, 12, (3), pp. 129–134.
- House, B, Kus, JV, Prayitno, N, Mair, R, Que, L, Chingcuanco, F, Gannon, V, Cvitkovitch, DG and Barnett Foster, D 2009, Acid-stress-induced changes in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157: H7 virulence, *Microbiology (Reading, England)*, 155, (Pt 9), pp. 2907–2918.
- Huang, Y, Hong, J, Zheng, S, Ding, Y, Guo, S, Zhang, H, Zhang, X, Du, Q and Liang, Z 2011, Elimination pathways of systemically delivered siRNA, *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 19, (2), pp. 381–385.
- Huang, Y-J, Tsai, T-Y and Pan, T-M 2007, Physiological response and protein expression under acid stress of Escherichia coli O157:H7 TWC01 isolated from Taiwan, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, (17), pp. 7182–7191.
- Hughes, DT, Clarke, MB, Yamamoto, K, Rasko, DA and Sperandio, V 2009, The QseC adrenergic signaling cascade in Enterohemorrhagic E. coli (EHEC), *PLoS pathogens*, 5, (8), p. e1000553.
- Hu, J, Ross, BN, Cieza, RJ and Torres, AG 2015, Finding regulators associated with the expression of the long polar fimbriae in enteropathogenic Escherichia coli, *Journal of Bacteriology*.
- Hung, DT and Mekalanos, JJ 2005, Bile acids induce cholera toxin expression in Vibrio cholerae in a ToxTindependent manner, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, (8), pp. 3028–3033.
- Hurley, BP, Thorpe, CM and Acheson, DW 2001, Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration, *Infection and Immunity*, 69, (10), pp. 6148–6155.

I

- Im, E and Pothoulakis, C 2010, Recent advances in Saccharomyces boulardii research, *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 34, Supplement 1, pp. S62–S70.
- In, J, Lukyanenko, V, Foulke-Abel, J, Hubbard, AL, Delannoy, M, Hansen, A-M, Kaper, JB, Boisen, N, Nataro, JP, Zhu, C, Boedeker, EC, Girón, JA and Kovbasnjuk, O 2013, Serine protease EspP from enterohemorrhagic Escherichia coli is sufficient to induce shiga toxin macropinocytosis in intestinal epithelium, *PloS One*, 8, (7), p. e69196.
- Iversen, H, Lindbäck, T, L'Abée-Lund, TM, Roos, N, Aspholm, M and Stenfors Arnesen, L 2015, The gut bacterium Bacteroides thetaiotaomicron influences the virulence potential of the enterohemorrhagic Escherichia coli O103:H25, *PloS One*, 10, (2), p. e0118140.

\boldsymbol{J}

- James, BW and Keevil, CW 1999, Influence of oxygen availability on physiology, verocytotoxin expression and adherence of Escherichia coli O157, *Journal of Applied Microbiology*, 86, (1), pp. 117–124.
- Jawhara, S, Habib, K, Maggiotto, F, Pignede, G, Vandekerckove, P, Maes, E, Dubuquoy, L, Fontaine, T, Guerardel, Y and Poulain, D 2012, Modulation of Intestinal Inflammation by Yeasts and Cell Wall Extracts: Strain Dependence and Unexpected Anti-Inflammatory Role of Glucan Fractions, *PLoS ONE*, 7, (7).
- Jedidi, H, Champagne, CP, Raymond, Y, Farnworth, E, Van Calsteren, M-R, Chouinard, PY and Fliss, I 2014, Effect of milk enriched with conjugated linoleic acid and digested in a simulator (TIM-1) on the viability of probiotic bacteria, *International Dairy Journal*, 37, (1), pp. 20–25.
- Johannes, L and Römer, W 2010, Shiga toxins from cell biology to biomedical applications, *Nature Reviews Microbiology*, 8, (2), pp. 105–116.
- Johansson, MEV and Hansson, GC 2011, Microbiology. Keeping bacteria at a distance, *Science (New York, N.Y.)*, 334, (6053), pp. 182–183.
- Johnson-Henry, KC, Donato, KA, Shen-Tu, G, Gordanpour, M and Sherman, PM 2008, Lactobacillus rhamnosus Strain GG Prevents Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-Induced Changes in Epithelial Barrier Function, *Infection and Immunity*, 76, (4), pp. 1340–1348.
- Joly, C, Gay-Quéheillard, J, Léké, A, Chardon, K, Delanaud, S, Bach, V and Khorsi-Cauet, H 2013, Impact of chronic exposure to low doses of chlorpyrifos on the intestinal microbiota in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) and in the rat, *Environmental Science and Pollution Research International*, 20, (5), pp. 2726–2734.
- Jones, BD, Ghori, N and Falkow, S 1994, Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches, *The Journal of Experimental Medicine*, 180, (1), pp. 15–23.
- Jordan, DM, Cornick, N, Torres, AG, Dean-Nystrom, EA, Kaper, JB and Moon, HW 2004, Long polar fimbriae contribute to colonization by Escherichia coli O157:H7 in vivo, *Infection and Immunity*, 72, (10), pp. 6168–6171.
- Jouany, J-P 2006, Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows, *Animal Reproduction Science*, 96, (3-4), pp. 250–264.
- Jung, C, Meinzer, U, Montcuquet, N, Thachil, E, Château, D, Thiébaut, R, Roy, M, Alnabhani, Z, Berrebi, D, Dussaillant, M, Pedruzzi, E, Thenet, S, Cerf-Bensussan, N, Hugot, J-P and Barreau, F 2012, Yersinia pseudotuberculosis disrupts intestinal barrier integrity through hematopoietic TLR-2 signaling, *The Journal of Clinical Investigation*, 122, (6), pp. 2239–2251.
- Junt, T, Scandella, E and Ludewig, B 2008, Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence, *Nature Reviews Immunology*, 8, (10), pp. 764–775.

${\cal K}$

- Kailasapathy, K and Chin, J 2000, Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp, *Immunology and Cell Biology*, 78, (1), pp. 80–88.
- Karmali, MA, Mascarenhas, M, Shen, S, Ziebell, K, Johnson, S, Reid-Smith, R, Isaac-Renton, J, Clark, C, Rahn, K and Kaper, JB 2003, Association of Genomic O Island 122 of Escherichia coli EDL 933 with Verocytotoxin-Producing Escherichia coli Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease, *Journal of Clinical Microbiology*, 41, (11), pp. 4930–4940.
- Karmali, MA, Steele, BT, Petric, M and Lim, C 1983, Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing Escherichia coli in stools, *Lancet (London, England)*, 1, (8325), pp. 619–620.
- Keeney, KM and Finlay, BB 2011, Enteric pathogen exploitation of the microbiota-generated nutrient environment of the gut, *Current Opinion in Microbiology*, 14, (1), pp. 92–98.
- Keeney, KM and Finlay, BB 2013, Microbiology: EHEC downregulates virulence in response to intestinal fucose, *Current biology: CB*, 23, (3), pp. R108–110.
- Keir, LS 2015, Shiga Toxin Associated Hemolytic Uremic Syndrome, *Hematology/Oncology Clinics of North* America, 29, (3), pp. 525–539.
- Keita, AV and Söderholm, JD 2012, Barrier dysfunction and bacterial uptake in the follicle-associated epithelium of ileal Crohn's disease, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1258, pp. 125–134.
- Kelesidis, T and Pothoulakis, C 2012, Efficacy and safety of the probiotic Saccharomyces boulardii for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders, *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 5, (2), pp. 111–125.
- Kemperman, RA, Gross, G, Mondot, S, Possemiers, S, Marzorati, M, Van de Wiele, T, Doré, J and Vaughan, EE 2013, Impact of polyphenols from black tea and red wine/grape juice on a gut model microbiome, *Food Research International*, 53, (2), pp. 659–669.
- Kendall, MM, Gruber, CC, Parker, CT and Sperandio, V 2012, Ethanolamine controls expression of genes encoding components involved in interkingdom signaling and virulence in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7, *mBio*, 3, (3).
- Kernéis, S, Bogdanova, A, Kraehenbuhl, J-P and Pringault, E 1997, Conversion by Peyer's Patch Lymphocytes of Human Enterocytes into M Cells that Transport Bacteria, *Science*, 277, (5328), pp. 949–952.
- Khalf, M, Dabour, N, Kheadr, E and Fliss, I 2010, Viability of probiotic bacteria in maple sap products under storage and gastrointestinal conditions, *Bioresource Technology*, 101, (20), pp. 7966–7972.
- Khan, NA, Roman, S, Peulen, O and Mion, F 2009, Physiologie Digestive, Pradel.
- Kheadr, E, Zihler, A, Dabour, N, Lacroix, C, Le Blay, G and Fliss, I 2010, Study of the physicochemical and biological stability of pediocin PA-1 in the upper gastrointestinal tract conditions using a dynamic in vitro model, *Journal of Applied Microbiology*, 109, (1), pp. 54–64.
- Kierszenbaum, AL 2006, Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique, De Boeck Supérieur.
- Kim, B-S, Kim, JN and Cerniglia, CE 2011, In vitro culture conditions for maintaining a complex population of human gastrointestinal tract microbiota, *BioMed Research International*, 2011.
- King, LA, Gouali, M, Mariani-Kurkdjian, Vaillant and et le réseau des néphrologues pédiatres 2013, Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 2012, *InVS*, pp. 1–4.
- King, LA, Mariani-Kurkdjian, Gouali, M, Vaillant, V and et le réseau des néphrologues pédiatres 2014, Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez les enfants de moins de 15ans en France en 2013, *InVS*, pp. 1–4.
- King, LA, Mariani-Kurkidjan, P and Gouali, M 2012, Encadré-Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France, *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire (BEH) du 9 mai*

2012 - Hors-série Risques microbiologiques alimentaires dans les produits d'origine animale surveillance et évaluation, p. 14.

- Kingsley, RA, Weening, EH, Keestra, AM and Bäumler, AJ 2002, Population heterogeneity of Salmonella enterica serotype Typhimurium resulting from phase variation of the lpf operon in vitro and in vivo, *Journal of Bacteriology*, 184, (9), pp. 2352–2359.
- Kiyono, H and Fukuyama, S 2004, NALT- versus PEYER'S-patch-mediated mucosal immunity, *Nature Reviews Immunology*, 4, (9), pp. 699–710.
- Klaenhammer, TR and Kullen, MJ 1999, Selection and design of probiotics, *International Journal of Food Microbiology*, 50, (1–2), pp. 45–57.
- Klein, SM, Elmer, GW, McFarland, LV, Surawicz, CM and Levy, RH 1993, Recovery and elimination of the biotherapeutic agent, Saccharomyces boulardii, in healthy human volunteers, *Pharmaceutical Research*, 10, (11), pp. 1615–1619.
- Klijn, A, Mercenier, A and Arigoni, F 2005, Lessons from the genomes of bifidobacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 29, (3), pp. 491–509.
- Klingberg, TD and Budde, BB 2006, The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage, *International Journal of Food Microbiology*, 109, (1–2), pp. 157–159.
- Koenig, JE, Spor, A, Scalfone, N, Fricker, AD, Stombaugh, J, Knight, R, Angenent, LT and Ley, RE 2011, Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, (Suppl 1), pp. 4578–4585.
- Koleva, PT, Bridgman, SL and Kozyrskyj, AL 2015, The infant gut microbiome: evidence for obesity risk and dietary intervention, *Nutrients*, 7, (4), pp. 2237–2260.
- Kong, F and Singh, RP 2010, A human gastric simulator (HGS) to study food digestion in human stomach, *Journal* of food science, 75, (9), pp. E627–E635.
- Koropatkin, NM, Cameron, EA and Martens, EC 2012, How glycan metabolism shapes the human gut microbiota, *Nature reviews. Microbiology*, 10, (5), pp. 323–335.
- Korte-Berwanger, M, Sakinc, T, Kline, K, Nielsen, HV, Hultgren, S and Gatermann, SG 2013, Significance of the D-serine-deaminase and D-serine metabolism of Staphylococcus saprophyticus for virulence, *Infection* and Immunity, 81, (12), pp. 4525–4533.
- Kumura, H, Tanoue, Y, Tsukahara, M, Tanaka, T and Shimazaki, K 2004, Screening of dairy yeast strains for probiotic applications, *Journal of dairy science*, 87, (12), pp. 4050–4056.
- Kus, JV, Gebremedhin, A, Dang, V, Tran, S-L, Serbanescu, A and Barnett Foster, D 2011, Bile salts induce resistance to polymyxin in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7, *Journal of Bacteriology*, 193, (17), pp. 4509–4515.

L

- Lafond, M, Bouza, B, Eyrichine, S, Bonnin, E, Crost, EH, Geraert, P-A, Giardina, T and Ajandouz, EH 2011, An integrative in vitro approach to analyse digestion of wheat polysaccharides and the effect of enzyme supplementation, *The British Journal of Nutrition*, 106, (2), pp. 264–273.
- Laird, BD, Peak, D and Siciliano, SD 2010, The effect of residence time and fluid volume to soil mass (LS) ratio on in vitro arsenic bioaccessibility from poorly crystalline scorodite, *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 45, (6), pp. 732–739.
- Laird, BD, Yeung, J, Peak, D and Siciliano, SD 2009, Nutritional status and gastrointestinal microbes affect arsenic bioaccessibility from soils and mine tailings in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem, *Environmental Science & Technology*, 43, (22), pp. 8652–8657.
- Lapeyraque, A-L, Malina, M, Fremeaux-Bacchi, V, Boppel, T, Kirschfink, M, Oualha, M, Proulx, F, Clermont, M-J, Le Deist, F, Niaudet, P and Schaefer, F 2011, Eculizumab in severe Shiga-toxin-associated HUS, *The New England Journal of Medicine*, 364, (26), pp. 2561–2563.

- Larsen, W 2003, Embryologie humaine, De Boeck Supérieur.
- Law, D 2000, Virulence factors of Escherichia coli O157 and other Shiga toxin-producing E. coli, *Journal of Applied Microbiology*, 88, (5), pp. 729–745.
- Lebeer, S, Vanderleyden, J and De Keersmaecker, SCJ 2010, Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens, *Nature Reviews Microbiology*, 8, (3), pp. 171–184.
- Leber, JH, Crimmins, GT, Raghavan, S, Meyer-Morse, NP, Cox, JS and Portnoy, DA 2008, Distinct TLR- and NLR-Mediated Transcriptional Responses to an Intracellular Pathogen, *PLoS Pathogens*, 4, (1).
- Lelouard, H, Fallet, M, de Bovis, B, Méresse, S and Gorvel, J 2012, Peyer's Patch Dendritic Cells Sample Antigens by Extending Dendrites Through M Cell-Specific Transcellular Pores, *Gastroenterology*, 142, (3), pp. 592–601.e3.
- Lepage, P, Seksik, P, Sutren, M, de la Cochetière, M-F, Jian, R, Marteau, P and Doré, J 2005, Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD, *Inflammatory Bowel Diseases*, 11, (5), pp. 473–480.
- Levi, CS and Lesmes, U 2014, Bi-compartmental elderly or adult dynamic digestion models applied to interrogate protein digestibility, *Food & Function*, 5, (10), pp. 2402–2409.
- Lewis, SB, Cook, V, Tighe, R and Schüller, S 2014, Enterohemorrhagic Escherichia coli colonization of human colonic epithelium in vitro and ex vivo, *Infection and Immunity*, pp. IAI.02928–14.
- Lila, MA, Ribnicky, DM, Rojo, LE, Rojas-Silva, P, Oren, A, Havenaar, R, Janle, EM, Raskin, I, Yousef, GG and Grace, MH 2012, Complementary approaches to gauge the bioavailability and distribution of ingested berry polyphenolics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, (23), pp. 5763–5771.
- Lin, J, Smith, MP, Chapin, KC, Baik, HS, Bennett, GN and Foster, JW 1996, Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic Escherichia coli, *Applied and Environmental Microbiology*, 62, (9), pp. 3094–3100.
- Li, Y, Kundu, P, Seow, SW, de Matos, CT, Aronsson, L, Chin, KC, Kärre, K, Pettersson, S and Greicius, G 2012, Gut microbiota accelerate tumor growth via c-jun and STAT3 phosphorylation in APCMin/+ mice, *Carcinogenesis*, 33, (6), pp. 1231–1238.
- Lloyd, SJ, Ritchie, JM, Rojas-Lopez, M, Blumentritt, CA, Popov, VL, Greenwich, JL, Waldor, MK and Torres, AG 2012, A Double, Long Polar Fimbria Mutant of Escherichia coli O157:H7 Expresses Curli and Exhibits Reduced In Vivo Colonization, *Infection and Immunity*, 80, (3), pp. 914–920.
- Lotz, M, Ménard, S and Hornef, M 2007, Innate immune recognition on the intestinal mucosa, *International Journal of Medical Microbiology*, 297, (5), pp. 379–392.
- Low, AS, Holden, N, Rosser, T, Roe, AJ, Constantinidou, C, Hobman, JL, Smith, DGE, Low, JC and Gally, DL 2006, Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7, *Environmental Microbiology*, 8, (6), pp. 1033–1047.
- Lukyanenko, V, Malyukova, I, Hubbard, A, Delannoy, M, Boedeker, E, Zhu, C, Cebotaru, L and Kovbasnjuk, O 2011, Enterohemorrhagic Escherichia coli infection stimulates Shiga toxin 1 macropinocytosis and transcytosis across intestinal epithelial cells, *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 301, (5), pp. C1140–1149.
- Luzader, DH, Clark, DE, Gonyar, LA and Kendall, MM 2013, EutR is a direct regulator of genes that contribute to metabolism and virulence in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7, *Journal of Bacteriology*, 195, (21), pp. 4947–4953.
- Lvova, L, Denis, S, Barra, A, Mielle, P, Salles, C, Vergoignan, C, Di Natale, C, Paolesse, R, Temple-Boyer, P and Feron, G 2012, Salt release monitoring with specific sensors in 'in vitro' oral and digestive environments from soft cheeses, *Talanta*, 97, pp. 171–180.

\mathcal{M}

- Maathuis, AJH, Keller, D and Farmer, S 2010, Survival and metabolic activity of the GanedenBC30 strain of Bacillus coagulans in a dynamic in vitro model of the stomach and small intestine, *Beneficial Microbes*, 1, (1), pp. 31–36.
- Macfarlane, GT and Macfarlane, LE 2009, Acquisition, Evolution and Maintenance of the Normal Gut Microbiota, *Digestive Diseases*, 27, (1), pp. 90–98.
- Macfarlane, GT, Macfarlane, S and Gibson, GR 1998, Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon, *Microbial Ecology*, 35, (2), pp. 180–187.
- Macfarlane, S, Woodmansey, EJ and Macfarlane, GT 2005, Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, (11), pp. 7483–7492.
- Maestre, R, Douglass, JD, Kodukula, S, Medina, I and Storch, J 2013, Alterations in the intestinal assimilation of oxidized PUFAs are ameliorated by a polyphenol-rich grape seed extract in an in vitro model and Caco-2 cells, *The Journal of Nutrition*, 143, (3), pp. 295–301.
- Mainville, I, Arcand, Y and Farnworth, ER 2005, A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics, *International journal of food microbiology*, 99, (3), pp. 287–296.
- Majowicz, SE, Scallan, E, Jones-Bitton, A, Sargeant, JM, Stapleton, J, Angulo, FJ, Yeung, DH and Kirk, MD 2014, Global Incidence of Human Shiga Toxin–Producing Escherichia coli Infections and Deaths: A Systematic Review and Knowledge Synthesis, *Foodborne Pathogens and Disease*, 11, (6), pp. 447–455.
- Makivuokko, H, Nurmi, J, Nurminen, P, Stowell, J and Rautonen, N 2005, In vitro effects on polydextrose by colonic bacteria and caco-2 cell cyclooxygenase gene expression, *Nutrition and cancer*, 52, (1), pp. 94–104.
- Mäkivuokko, H, Wacklin, P, Koenen, ME, Laamanen, K, Alakulppi, N, Venema, K and Mättö, J 2012, Isolation of bifidobacteria for blood group secretor status targeted personalised nutrition, *Microbial Ecology in Health and Disease*, 23.
- Malagelada, JR, Go, VL and Summerskill, WH 1979, Different gastric, pancreatic, and biliary responses to solidliquid or homogenized meals, *Digestive Diseases and Sciences*, 24, (2), pp. 101–110.
- Malik-Kale, P, Parker, CT and Konkel, ME 2008, Culture of Campylobacter jejuni with sodium deoxycholate induces virulence gene expression, *Journal of Bacteriology*, 190, (7), pp. 2286–2297.
- Maresca, M, Dumay, E, Fantini, J and Caporiccio, B 2007, Selective transport of staphylococcal enterotoxin A through in vitro generated human M cells, *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 9, (12-13), pp. 1507–1510.
- Mariani-Kurkdjian, P and Bingen, É 2012, Physiopathologie et virulence des Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines, *Réanimation*, 21, (3), pp. 268–279.
- Mariani-Kurkdjian, P and Bonacorsi, S 2014, Diagnostic des infections à Escherichia coli entérohémorragiques., *Feuillets de Biologie*, 55, (317).
- Marra, A and Isberg, RR 1997, Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of Yersinia pseudotuberculosis across the Peyer's patch intestinal epithelium., *Infection and Immunity*, 65, (8), pp. 3412–3421.
- Marshall, B and Warren, JR 1984, Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration, *The Lancet*, 323, (8390), pp. 1311–1315.
- Marteau, P, Minekus, M, Havenaar, R and Huis in't Veld, JH 1997, Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile, *Journal of Dairy Science*, 80, (6), pp. 1031–1037.
- Martinez-Argudo, I and Jepson, MA 2008, Salmonella translocates across an in vitro M cell model independently of SPI-1 and SPI-2, *Microbiology (Reading, England)*, 154, (Pt 12), pp. 3887–3894.

- Martinez, RCR, Aynaou, A-E, Albrecht, S, Schols, HA, De Martinis, ECP, Zoetendal, EG, Venema, K, Saad, SMI and Smidt, H 2011, In vitro evaluation of gastrointestinal survival of Lactobacillus amylovorus DSM 16698 alone and combined with galactooligosaccharides, milk and/or Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bb-12, *International Journal of Food Microbiology*, 149, (2), pp. 152–158.
- Martins, FS, Rodrigues, ACP, Tiago, FC, Penna, FJ, Rosa, CA, Arantes, RM, Nardi, RM, Neves, MJ and Nicoli, JR 2007, Saccharomyces cerevisiae strain 905 reduces the translocation of Salmonella enterica serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice, *Journal of medical microbiology*, 56, (3), pp. 352–359.
- Marzorati, M, Maignien, L, Verhelst, A, Luta, G, Sinnott, R, Kerckhof, FM, Boon, N, Van de Wiele, T and Possemiers, S 2013, Barcoded pyrosequencing analysis of the microbial community in a simulator of the human gastrointestinal tract showed a colon region-specific microbiota modulation for two plant-derived polysaccharide blends, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103, (2), pp. 409–420.
- Marzorati, M, Possemiers, S, Van Den Abbeele, P, Van De Wiele, T, Vanhoecke, B and Verstraete, W 2014, Technology and method to study microbial growth and adhesion to host-related surfaces and the hostmicrobiota interaction, Google Patents.
- Marzorati, M, Vanhoecke, B, De Ryck, T, Sadabad, MS, Pinheiro, I, Possemiers, S, Van den Abbeele, P, Derycke, L, Bracke, M, Pieters, J and others 2014, The HMITM module: A new tool to study the Host-Microbiota Interaction in the human gastrointestinal tract in vitro, *BMC microbiology*, 14, (1), p. 133.
- Marzorati, M, Verhelst, A, Luta, G, Sinnott, R, Verstraete, W, Van de Wiele, T and Possemiers, S 2010, In vitro modulation of the human gastrointestinal microbial community by plant-derived polysaccharide-rich dietary supplements, *International Journal of Food Microbiology*, 139, (3), pp. 168–176.
- McFarland, LV 2015, From Yaks to Yogurt: The History, Development, and Current Use of Probiotics, *Clinical Infectious Diseases*, 60, (suppl 2), pp. S85–S90.
- McFarland, LV 2010, Systematic review and meta-analysis of Saccharomyces boulardii in adult patients, *World journal of gastroenterology: WJG*, 16, (18), pp. 2202–2222.
- McWilliams, BD and Torres, AG 2014, EHEC Adhesins, Microbiology spectrum, 2, (2), pp. EHEC-0003-2013.
- Meinzer, U, Barreau, F, Esmiol-Welterlin, S, Jung, C, Villard, C, Léger, T, Ben-Mkaddem, S, Berrebi, D, Dussaillant, M, Alnabhani, Z, Roy, M, Bonacorsi, S, Wolf-Watz, H, Perroy, J, Ollendorff, V and Hugot, J-P 2012, Yersinia pseudotuberculosis effector YopJ subverts the Nod2/RICK/TAK1 pathway and activates caspase-1 to induce intestinal barrier dysfunction, *Cell Host & Microbe*, 11, (4), pp. 337–351.
- Ménard, O, Cattenoz, T, Guillemin, H, Souchon, I, Deglaire, A, Dupont, D and Picque, D 2014, Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion, *Food Chemistry*, 145, pp. 1039–1045.
- Mercuri, A, Passalacqua, A, Wickham, MSJ, Faulks, RM, Craig, DQM and Barker, SA 2011, The Effect of Composition and Gastric Conditions on the Self-Emulsification Process of Ibuprofen-Loaded Self-Emulsifying Drug Delivery Systems: A Microscopic and Dynamic Gastric Model Study, *Pharmaceutical Research*, 28, (7), pp. 1540–1551.
- Merritt, ME and Donaldson, JR 2009, Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria, *Journal of Medical Microbiology*, 58, (12), pp. 1533–1541.
- Mesaros, N, Van Bambeke, F, Glupczynski, Y, Vanhoof, R and Tulkens, PM 2005, L'efflux des antibiotiques: Un mécanisme ubiquitaire conduisant à la résistance. Etat de la question et implications microbiologiques et cliniques, *Louvain médical*, 124, (8), pp. 308–20.
- Miller, TL and Wolin, MJ 1981, Fermentation by the human large intestine microbial community in an in vitro semicontinuous culture system., *Applied and environmental microbiology*, 42, (3), pp. 400–407.
- Millsap, KW, van der Mei, HC, Bos, R and Busscher, HJ 1998, Adhesive interactions between medically important yeasts and bacteria, *FEMS microbiology reviews*, 21, (4), pp. 321–336.
- Minekus, M 2015, The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM), *The Impact of Food Bioactives on Health*, Springer, pp. 37–46.
- Minekus, M, Alminger, M, Alvito, P, Ballance, S, Bohn, T, Bourlieu, C, Carrière, F, Boutrou, R, Corredig, M, Dupont, D, Dufour, C, Egger, L, Golding, M, Karakaya, S, Kirkhus, B, Le Feunteun, S, Lesmes, U, Macierzanka, A, Mackie, A, Marze, S, McClements, DJ, Ménard, O, Recio, I, Santos, CN, Singh, RP, Vegarud, GE, Wickham, MSJ, Weitschies, W and Brodkorb, A 2014, A standardised static in vitro digestion method suitable for food an international consensus, *Food & Function*, 5, (6), pp. 1113–1124.

- Minekus, M, Marteau, P, Havenaar, R and others 1995, A multi-compartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine, *Alternatives to laboratory animals: ATLA*, (23), pp. 197–209.
- Minelli, EB and Benini, A 2008, Relationship between number of bacteria and their probiotic effects, *Microbial Ecology in Health and Disease*, 20, (4), pp. 180–183.
- Miquel, S, Beaumont, M, Martín, R, Langella, P, Braesco, V and Thomas, M 2015, A proposed framework for an appropriate evaluation scheme for microorganisms as novel foods with a health claim in Europe, *Microbial Cell Factories*, 14, p. 48.
- Miszczycha, SD, Thévenot, J, Denis, S, Callon, C, Livrelli, V, Alric, M, Montel, M-C, Blanquet-Diot, S and Thevenot-Sergentet, D 2014, Survival of Escherichia coli O26:H11 exceeds that of Escherichia coli O157:H7 as assessed by simulated human digestion of contaminated raw milk cheeses, *International Journal of Food Microbiology*, 172, pp. 40–48.
- Moal, VL-L and Servin, AL 2006, The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota, *Clinical Microbiology Reviews*, 19, (2), pp. 315–337.
- Mohammed Hamzah, A, Mohammed Hussein, A and Mahmoud Khalef, J 2013, Isolation of Escherichia coli 0157:H7 strain from fecal samples of zoo animal, *TheScientificWorldJournal*, 2013, p. 843968.
- Mohawk, KL and O'Brien, AD 2011, Mouse models of Escherichia coli O157:H7 infection and shiga toxin injection, *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, p. 258185.
- Mo, H, Kariluoto, S, Piironen, V, Zhu, Y, Sanders, MG, Vincken, J-P, Wolkers-Rooijackers, J and Nout, MJR 2013, Effect of soybean processing on content and bioaccessibility of folate, vitamin B12 and isoflavones in tofu and tempe, *Food Chemistry*, 141, (3), pp. 2418–2425.
- Mo, H, Zhu, Y and Nout, MJR 2012, In vitro digestion enhances anti-adhesion effect of tempe and tofu against Escherichia coli, *Letters in Applied Microbiology*, 54, (2), pp. 166–168.
- Møller, COA, Nauta, MJ, Christensen, BB, Dalgaard, P and Hansen, TB 2012, Modelling transfer of Salmonella Typhimurium DT104 during simulation of grinding of pork, *Journal of Applied Microbiology*, 112, (1), pp. 90–98.
- Molly, K, Woestyne, MV, Smet, ID and Verstraete, W 1994, Validation of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganism-associated activities, *Microbial Ecology in Health and Disease*, 7, (4), pp. 191–200.
- Molly, K, Woestyne, MV and Verstraete, W 1993, Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, (2), pp. 254–258.
- Momose, Y, Hirayama, K and Itoh, K 2008, Effect of organic acids on inhibition of Escherichia coli O157:H7 colonization in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93, (1-2), pp. 141–149.
- Montalto, M, D'onofrio, F, Gallo, A, Cazzato, A and Gasbarrini, G 2009, Intestinal microbiota and its functions, *Digestive and Liver Disease Supplements*, 3, (2), pp. 30–34.
- Mowat, AM 2003, Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens, *Nature Reviews Immunology*, 3, (4), pp. 331–341.
- Mukhopadhyay, S and Linstedt, AD 2012, Manganese blocks intracellular trafficking of Shiga toxin and protects against Shiga toxicosis, *Science (New York, N.Y.)*, 335, (6066), pp. 332–335.
- Murray, MD and Brater, DC 1993, Renal toxicity of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 33, pp. 435–465.

${\mathcal N}$

- Nabil, S, Gauthier, SF, Drouin, R, Poubelle, PE and Pouliot, Y 2011, In vitro digestion of proteins and growth factors in a bovine whey protein extract as determined using a computer-controlled dynamic gastrointestinal system (TIM-1), *Food digestion*, 2, (1-3), pp. 13–22.
- Nagano, K, Taguchi, K, Tokoro, S, Tatsuno, I and Mori, H 2014, Adhesion of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 to the intestinal epithelia is essential for inducing secretory IgA antibody production in the intestine of mice, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 37, (3), pp. 409–416.
- Nakanishi, N, Tashiro, K, Kuhara, S, Hayashi, T, Sugimoto, N and Tobe, T 2009, Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohaemorrhagic Escherichia coli, *Microbiology*, 155, (2), pp. 521–530.
- Nalin, T, Venema, K, Weinstein, DA, de Souza, CFM, Perry, IDS, van Wandelen, MTR, van Rijn, M, Smit, GPA, Schwartz, IVD and Derks, TGJ 2015, In vitro digestion of starches in a dynamic gastrointestinal model: an innovative study to optimize dietary management of patients with hepatic glycogen storage diseases, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38, (3), pp. 529–536.
- Nardone, G and Compare, D 2015, The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases?, *United European Gastroenterology Journal*, 3, (3), pp. 255–260.
- Nataro, JP and Kaper, JB 1998, Diarrheagenic Escherichia coli, *Clinical Microbiology Reviews*, 11, (1), pp. 142–201.
- Naylor, SW, Gally, DL and Low, JC 2005, Enterohaemorrhagic E. coli in veterinary medicine, *International journal of medical microbiology: IJMM*, 295, (6-7), pp. 419–441.
- Neutra, MR, Pringault, E and Kraehenbuhl, J-P 1996, Antigen Sampling Across Epithelial Barriers and Induction of Mucosal Immune Responses, *Annual Review of Immunology*, 14, (1), pp. 275–300.
- Newton, HJ, Sloan, J, Bennett-Wood, V, Adams, LM, Robins-Browne, RM and Hartland, EL 2004, Contribution of Long Polar Fimbriae to the Virulence of Rabbit-Specific Enteropathogenic Escherichia coli, *Infection and Immunity*, 72, (3), pp. 1230–1239.
- Njoroge, J and Sperandio, V 2012, Enterohemorrhagic Escherichia coli virulence regulation by two bacterial adrenergic kinases, QseC and QseE, *Infection and Immunity*, 80, (2), pp. 688–703.
- Njoroge, JW, Nguyen, Y, Curtis, MM, Moreira, CG and Sperandio, V 2012, Virulence meets metabolism: Cra and KdpE gene regulation in enterohemorrhagic Escherichia coli, *mBio*, 3, (5), pp. e00280–00212.
- Northfield, TC and McColl, I 1973, Postprandial concentrations of free and conjugated bile acids down the length of the normal human small intestine, *Gut*, 14, (7), pp. 513–518.

0

- Odumosu, O, Nicholas, D, Yano, H and Langridge, W 2010, AB toxins: a paradigm switch from deadly to desirable, *Toxins*, 2, (7), pp. 1612–1645.
- Oelschlaeger, TA 2010, Mechanisms of probiotic actions A review, International Journal of Medical Microbiology, 300, (1), pp. 57–62.
- Ogawa, M, Shimizu, K, Nomoto, K, Takahashi, M, Watanuki, M, Tanaka, R, Tanaka, T, Hamabata, T, Yamasaki, S and Takeda, Y 2001, Protective effect of Lactobacillus casei strain Shirota on Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 infection in infant rabbits, *Infection and Immunity*, 69, (2), pp. 1101–1108.
- O'Hara, AM and Shanahan, F 2006, The gut flora as a forgotten organ, EMBO reports, 7, (7), pp. 688-693.
- Öhrvik, V, Öhrvik, H, Tallkvist, J and Witthöft, C 2010, Folates in bread: retention during bread-making and in vitro bioaccessibility, *European Journal of Nutrition*, 49, (6), pp. 365–372.
- Olsén, A, Wick, MJ, Mörgelin, M and Björck, L 1998, Curli, Fibrous Surface Proteins of Escherichia coli, Interact with Major Histocompatibility Complex Class I Molecules, *Infection and Immunity*, 66, (3), pp. 944–949.

- Oomen, AG, Rompelberg, CJM, Bruil, MA, Dobbe, CJG, Pereboom, D and Sips, A 2003, Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants, *Archives of Environmental Contamination and toxicology*, 44, (3), pp. 0281–0287.
- Orth, D, Grif, K, Khan, AB, Naim, A, Dierich, MP and Würzner, R 2007, The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59, (3), pp. 235–242.
- O'Shea, EF, O'Connor, PM, Raftis, EJ, O'Toole, PW, Stanton, C, Cotter, PD, Ross, RP and Hill, C 2011, Production of multiple bacteriocins from a single locus by gastrointestinal strains of Lactobacillus salivarius, *Journal of Bacteriology*, 193, (24), pp. 6973–6982.
- O'Toole, PW and Claesson, MJ 2010, Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly, *International Dairy Journal*, 20, (4), pp. 281–291.
- O'Toole, PW and Cooney, JC 2008, Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota, *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2008.
- Otte, J-M and Podolsky, DK 2004, Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms, *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286, (4), pp. G613–G626.
- Ouethrani, M, Van de Wiele, T, Verbeke, E, Bruneau, A, Carvalho, M, Rabot, S and Camel, V 2013, Metabolic fate of ochratoxin A as a coffee contaminant in a dynamic simulator of the human colon, *Food Chemistry*, 141, (4), pp. 3291–3300.

\mathcal{P}

- Pacheco, AR, Curtis, MM, Ritchie, JM, Munera, D, Waldor, MK, Moreira, CG and Sperandio, V 2012, Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization, *Nature*, 492, (7427), pp. 113–117.
- Pacheco, AR and Sperandio, V 2012, Shiga toxin in enterohemorrhagic E.coli: regulation and novel anti-virulence strategies, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, p. 81.
- Pal, A, Indireshkumar, K, Schwizer, W, Abrahamsson, B, Fried, M and Brasseur, JG 2004, Gastric flow and mixing studied using computer simulation, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 271, (1557), pp. 2587–2594.
- Panos, GZ, Betsi, GI and Falagas, ME 2006, Systematic review: are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with Escherichia coli O157:H7 infection?, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 24, (5), pp. 731–742.
- Payne, AN, Zihler, A, Chassard, C and Lacroix, C 2012, Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling, *Trends in biotechnology*, 30, (1), pp. 17–25.
- Pearson, JS and Hartland, EL 2014, The Inflammatory Response during Enterohemorrhagic Escherichia coli Infection, *Microbiology Spectrum*, 2, (4).
- Pecquet, S, Guillaumin, D, Tancrede, C and Andremont, A 1991, Kinetics of Saccharomyces cerevisiae elimination from the intestines of human volunteers and effect of this yeast on resistance to microbial colonization in gnotobiotic mice., *Applied and Environmental Microbiology*, 57, (10), pp. 3049–3051.
- Pei, Z, Bini, EJ, Yang, L, Zhou, M, Francois, F and Blaser, MJ 2004, Bacterial biota in the human distal esophagus, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, (12), pp. 4250–4255.
- Penner, R, Fedorak, RN and Madsen, KL 2005, Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases, *Current Opinion in Pharmacology*, 5, (6), pp. 596–603.
- Perna, NT, Plunkett, G, Burland, V, Mau, B, Glasner, JD, Rose, DJ, Mayhew, GF, Evans, PS, Gregor, J, Kirkpatrick, HA, Pósfai, G, Hackett, J, Klink, S, Boutin, A, Shao, Y, Miller, L, Grotbeck, EJ, Davis, NW, Lim, A, Dimalanta, ET, Potamousis, KD, Apodaca, J, Anantharaman, TS, Lin, J, Yen, G, Schwartz, DC, Welch, RA and Blattner, FR 2001, Genome sequence of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7, *Nature*, 409, (6819), pp. 529–533.

- Peterson, LW and Artis, D 2014, Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis, *Nature Reviews Immunology*, 14, (3), pp. 141–153.
- Phillips, AD, Navabpour, S, Hicks, S, Dougan, G, Wallis, T and Frankel, G 2000, Enterohaemorrhagic Escherichia coliO157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine, *Gut*, 47, (3), pp. 377–381.
- Piatek, R, Zalewska-Piatek, B, Dzierzbicka, K, Makowiec, S, Pilipczuk, J, Szemiako, K, Cyranka-Czaja, A and Wojciechowski, M 2013, Pilicides inhibit the FGL chaperone/usher assisted biogenesis of the Dr fimbrial polyadhesin from uropathogenic Escherichia coli, *BMC microbiology*, 13, p. 131.
- Pineton de Chambrun, G, Neut, C, Chau, A, Cazaubiel, M, Pelerin, F, Justen, P and Desreumaux, P 2015, A randomized clinical trial of Saccharomyces cerevisiae versus placebo in the irritable bowel syndrome, *Digestive and Liver Disease*, 47, (2), pp. 119–124.
- Pollet, A, Van Craeyveld, V, Van de Wiele, T, Verstraete, W, Delcour, JA and Courtin, CM 2012, In vitro fermentation of arabinoxylan oligosaccharides and low molecular mass arabinoxylans with different structural properties from wheat (Triticum aestivum L.) bran and psyllium (Plantago ovata Forsk) seed husk, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, (4), pp. 946–954.
- Poltavska, OA and Kovalenko, NK 2012, Antimicrobial activity of bifidobacterial bacteriocin-like substances, *Mikrobiolohichnyĭ Zhurnal (Kiev, Ukraine: 1993)*, 74, (5), pp. 32–42.
- Polzin, S, Huber, C, Eylert, E, Elsenhans, I, Eisenreich, W and Schmidt, H 2013, Growth media simulating ileal and colonic environments affect the intracellular proteome and carbon fluxes of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 strain EDL933, *Applied and Environmental Microbiology*, 79, (12), pp. 3703–3715.
- Possemiers, S, Marzorati, M, Verstraete, W and Van de Wiele, T 2010, Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery, *International Journal of Food Microbiology*, 141, (1-2), pp. 97–103.
- Possemiers, S, Pinheiro, I, Verhelst, A, Van den Abbeele, P, Maignien, L, Laukens, D, Reeves, SG, Robinson, LE, Raas, T, Schneider, Y-J, Van de Wiele, T and Marzorati, M 2013, A dried yeast fermentate selectively modulates both the luminal and mucosal gut microbiota and protects against inflammation, as studied in an integrated in vitro approach, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, (39), pp. 9380–9392.
- Pradel, N, Champs, CD, Palcoux, JB, Sirot, J, Forestier, C, Joly, B, Scheutz, F and Livrelli, V 2000, Les infections à Escherichia coli producteurs de vérotoxines: étude de la prévalence chez l'enfant dans la région Auvergne, *Archives de Pédiatrie*, 7, Supplement 3, pp. S544–S550.
- Pradel, N, Leroy-Setrin, S, Joly, B and Livrelli, V 2002, Genomic Subtraction To Identify and Characterize Sequences of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli O91:H21, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, (5), pp. 2316–2325.
- Pradel, N, Livrelli, V, De Champs, C, Palcoux, JB, Reynaud, A, Scheutz, F, Sirot, J, Joly, B and Forestier, C 2000, Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France, *Journal of Clinical Microbiology*, 38, (3), pp. 1023–1031.
- Prager, R, Fruth, A, Busch, U and Tietze, E 2011, Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of Shiga toxin 2g and heat-stable enterotoxin STIa encoding Escherichia coli isolates from humans, animals, and environmental sources, *International journal of medical microbiology: IJMM*, 301, (3), pp. 181–191.
- Preidis, GA, Hill, C, Guerrant, RL, Ramakrishna, BS, Tannock, GW and Versalovic, J 2011, Probiotics, enteric and diarrheal diseases, and global health, *Gastroenterology*, 140, (1), pp. 8–14.
- Press, Hauptmann, Hauptmann, Fuchs, Fuchs, Ewe and Ramadori 1998, Gastrointestinal pH profiles in patients with inflammatory bowel disease, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 12, (7), pp. 673–678.
- Price, SB, Wright, JC, DeGraves, FJ, Castanie-Cornet, M-P and Foster, JW 2004, Acid resistance systems required for survival of Escherichia coli O157:H7 in the bovine gastrointestinal tract and in apple cider are different, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, (8), pp. 4792–4799.
- Prouty, AM, Brodsky, IE, Manos, J, Belas, R, Falkow, S and Gunn, JS 2004, Transcriptional regulation of Salmonella enterica serovar Typhimurium genes by bile, *FEMS immunology and medical microbiology*, 41, (2), pp. 177–185.

- Psani, M and Kotzekidou, P 2006, Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, (12), pp. 1329–1336.
- Puhar, A and Sansonetti, PJ 2014, Type III secretion system, Current biology: CB, 24, (17), pp. R784-791.
- Putaala, H, Salusjärvi, T, Nordström, M, Saarinen, M, Ouwehand, AC, Bech Hansen, E and Rautonen, N 2008, Effect of four probiotic strains and Escherichia coli O157:H7 on tight junction integrity and cyclooxygenase expression, *Research in Microbiology*, 159, (9–10), pp. 692–698.

R

Rambaud, J-C 2004, Flore microbienne intestinale: physiologie et pathologie digestives, John Libbey Eurotext.

- Rangel, JM, Sparling, PH, Crowe, C, Griffin, PM and Swerdlow, DL 2005, Epidemiology of Escherichia coli O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002, *Emerging Infectious Diseases*, 11, (4), pp. 603–609.
- Rasko, DA and Sperandio, V 2010, Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease, *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, (2), pp. 117–128.
- Reid, G, Gibson, G, Sanders, ME, Guarner, F, Versalovic, J and others 2008, Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis, *The Lancet*, 372, (9633), pp. 112–113.
- Reilly, A 1998, Prevention and control of enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC) infections: memorandum from a WHO meeting. WHO Consultation on Prevention and Control of Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC) Infections, *Bulletin of the World Health Organization*, 76, (3), pp. 245–255.
- Reissbrodt, R, Hammes, WP, dal Bello, F, Prager, R, Fruth, A, Hantke, K, Rakin, A, Starcic-Erjavec, M and Williams, PH 2009, Inhibition of growth of Shiga toxin-producing Escherichia coli by nonpathogenic Escherichia coli, *FEMS microbiology letters*, 290, (1), pp. 62–69.
- Rhoades, JR, Duffy, G and Koutsoumanis, K 2009, Prevalence and concentration of verocytotoxigenic Escherichia coli, Salmonella enterica and Listeria monocytogenes in the beef production chain: a review, *Food Microbiology*, 26, (4), pp. 357–376.
- Ribnicky, DM, Roopchand, DE, Oren, A, Grace, M, Poulev, A, Lila, MA, Havenaar, R and Raskin, I 2014, Effects of a high fat meal matrix and protein complexation on the bioaccessibility of blueberry anthocyanins using the TNO gastrointestinal model (TIM-1), *Food Chemistry*, 142, pp. 349–357.
- Richelle, M, Sanchez, B, Tavazzi, I, Lambelet, P, Bortlik, K and Williamson, G 2010, Lycopene isomerisation takes place within enterocytes during absorption in human subjects, *British journal of nutrition*, 103, (12), pp. 1800–1807.
- Riley, LW, Remis, RS, Helgerson, SD, McGee, HB, Wells, JG, Davis, BR, Hebert, RJ, Olcott, ES, Johnson, LM, Hargrett, NT, Blake, PA and Cohen, ML 1983, Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype, *The New England Journal of Medicine*, 308, (12), pp. 681–685.
- Ritchie, JM 2015, Animal Models of Enterohemorrhagic Escherichia coli Infection, in V Sperandio & CJ Hovde (eds), *Enterohemorrhagic Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing E. coli*, American Society of Microbiology, pp. 175–195.
- Roberts, CL, Keita, ÅV, Duncan, SH, O'Kennedy, N, Söderholm, JD, Rhodes, JM and Campbell, BJ 2010, Translocation of Crohn's disease Escherichia coli across M-cells: contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers, *Gut*, 59, (10), pp. 1331–1339.
- Rodes, L, Tomaro-Duchesneau, C, Saha, S, Paul, A, Malhotra, M, Marinescu, D, Shao, W, Kahouli, I and Prakash, S 2014, Enrichment of Bifidobacterium longum subsp. infantis ATCC 15697 within the human gut microbiota using alginate-poly-L-lysine-alginate microencapsulation oral delivery system: an in vitro analysis using a computer-controlled dynamic human gastrointestinal model, *Journal of Microencapsulation*, 31, (3), pp. 230–238.
- Rojas-López, M, Arenas-Hernández, MMP, Medrano-López, A, Martínez de la Peña, CF, Puente, JL, Martínez-Laguna, Y and Torres, AG 2011, Regulatory control of the Escherichia coli O157:H7 lpfl operon by H-NS and Ler, *Journal of Bacteriology*, 193, (7), pp. 1622–1632.

- Rousseaux, C, Bouguen, G, Dubuquoy, C, Dubuquoy, L, Vandekerckove, P and Desreumaux, P 2010, 274 Sacharomyces Cerevisiae Cncm I-3856 Decreases Intestinal Pain Through PPAR Alpha Activation in the Gut, *Gastroenterology*, 138, (5), p. S–51.
- Rul, F, Ben-Yahia, L, Chegdani, F, Wrzosek, L, Thomas, S, Noordine, M-L, Gitton, C, Cherbuy, C, Langella, P and Thomas, M 2011, Impact of the Metabolic Activity of Streptococcus thermophilus on the Colon Epithelium of Gnotobiotic Rats, *The Journal of Biological Chemistry*, 286, (12), pp. 10288–10296.
- Rund, SA, Rohde, H, Sonnenborn, U and Oelschlaeger, TA 2013, Antagonistic effects of probiotic Escherichia coli Nissle 1917 on EHEC strains of serotype O104:H4 and O157:H7, *International Journal of Medical Microbiology*, 303, (1), pp. 1–8.
- Russo, P, de Chiara, MLV, Vernile, A, Amodio, ML, Arena, MP, Capozzi, V, Massa, S and Spano, G 2014, Fresh-Cut Pineapple as a New Carrier of Probiotic Lactic Acid Bacteria, *BioMed Research International*, 2014.

S

- de Sablet, T, Chassard, C, Bernalier-Donadille, A, Vareille, M, Gobert, AP and Martin, C 2009, Human Microbiota-Secreted Factors Inhibit Shiga Toxin Synthesis by Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7, *Infection and Immunity*, 77, (2), pp. 783–790.
- Salyers, AA, Palmer, JK and Wilkins, TD 1978, Degradation of polysaccharides by intestinal bacterial enzymes, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 31, (10), pp. S128–S130.
- Sanchez, JI, Marzorati, M, Grootaert, C, Baran, M, Van Craeyveld, V, Courtin, CM, Broekaert, WF, Delcour, JA, Verstraete, W and Van de Wiele, T 2009, Arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) affect the protein/carbohydrate fermentation balance and microbial population dynamics of the Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem, *Microbial Biotechnology*, 2, (1), pp. 101–113.
- Sánchez-Patán, F, Barroso, E, van de Wiele, T, Jiménez-Girón, A, Martín-Alvarez, PJ, Moreno-Arribas, MV, Martínez-Cuesta, MC, Peláez, C, Requena, T and Bartolomé, B 2015, Comparative in vitro fermentations of cranberry and grape seed polyphenols with colonic microbiota, *Food Chemistry*, 183, pp. 273–282.
- Sanders, ME 2008, Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses, *Clinical Infectious Diseases*, 46, (Supplement 2), pp. S58–S61.
- Sansonetti, PJ 2004, War and peace at mucosal surfaces, Nature Reviews. Immunology, 4, (12), pp. 953–964.
- Savolainen, K, Kotti, TJ, Schmitz, W, Savolainen, TI, Sormunen, RT, Ilves, M, Vainio, SJ, Conzelmann, E and Hiltunen, JK 2004, A mouse model for alpha-methylacyl-CoA racemase deficiency: adjustment of bile acid synthesis and intolerance to dietary methyl-branched lipids, *Human Molecular Genetics*, 13, (9), pp. 955–965.
- Saxena, T, Kaushik, P and Krishna Mohan, M 2015, Prevalence of E. coli O157:H7 in water sources: an overview on associated diseases, outbreaks and detection methods, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 82, (3), pp. 249–264.
- Schamberger, GP, Phillips, RL, Jacobs, JL and Diez-Gonzalez, F 2004, Reduction of Escherichia coli O157:H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing E. coli to feed, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, (10), pp. 6053–6060.
- Scheiring, J, Rosales, A and Zimmerhackl, LB 2010, Clinical practice. Today's understanding of the haemolytic uraemic syndrome, *European Journal of Pediatrics*, 169, (1), pp. 7–13.
- Scheutz, F, Teel, LD, Beutin, L, Piérard, D, Buvens, G, Karch, H, Mellmann, A, Caprioli, A, Tozzoli, R, Morabito, S, Strockbine, NA, Melton-Celsa, AR, Sanchez, M, Persson, S and O'Brien, AD 2012, Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature, *Journal of Clinical Microbiology*, 50, (9), pp. 2951–2963.
- Schmidt, B, Mulder, IE, Musk, CC, Aminov, RI, Lewis, M, Stokes, CR, Bailey, M, Prosser, JI, Gill, BP, Pluske, JR and Kelly, D 2011, Establishment of Normal Gut Microbiota Is Compromised under Excessive Hygiene Conditions, *PLoS ONE*, 6, (12), p. e28284.

- Schneider, S-M, Girard-Pipau, F, Filippi, J, Hebuterne, X, Moyse, D, Hinojosa, G-C, Pompei, A and Rampal, P 2005, Effects of Saccharomyces boulardii on fecal short-chain fatty acids and microflora in patients on long-term total enteral nutrition, *World journal of gastroenterology: WJG*, 11, (39), pp. 6165–6169.
- Schüller, S 2011, Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium, Toxins, 3, (6), pp. 626-639.
- Schüller, S, Heuschkel, R, Torrente, F, Kaper, JB and Phillips, AD 2007, Shiga toxin binding in normal and inflamed human intestinal mucosa, *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 9, (1), pp. 35–39.
- Schüller, S and Phillips, AD 2010, Microaerobic conditions enhance type III secretion and adherence of enterohaemorrhagic Escherichia coli to polarized human intestinal epithelial cells, *Environmental Microbiology*, 12, (9), pp. 2426–2435.
- Segarra-Newnham, M 2007, Probiotics for Clostridium Difficile–Associated Diarrhea: Focus on Lactobacillus rhamnosus GG and Saccharomyces boulardii, *Annals of Pharmacotherapy*, 41, (7-8), pp. 1212–1221.
- Selsted, ME and Ouellette, AJ 2005, Mammalian defensins in the antimicrobial immune response, *Nature Immunology*, 6, (6), pp. 551–557.
- Serna, A and Boedeker, EC 2008, Pathogenesis and treatment of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections:, *Current Opinion in Gastroenterology*, 24, (1), pp. 38–47.
- Shaikh, N, Holt, NJ, Johnson, JR and Tarr, PI 2007, Fim operon variation in the emergence of Enterohemorrhagic Escherichia coli: an evolutionary and functional analysis, *FEMS Microbiology Letters*, 273, (1), pp. 58– 63.
- Sherwood, L 2006, Physiologie humaine: A Human Perspective, De Boeck Supérieur.
- Shigeno, T, Akamatsu, T, Fujimori, K, Nakatsuji, Y and Nagata, A 2002, The Clinical Significance of Colonoscopy in Hemorrhagic Colitis Due to Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 Infection, *Endoscopy*, 34, (4), pp. 311–314.
- Shulman, ST, Friedmann, HC and Sims, RH 2007, Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician?, *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45, (8), pp. 1025–1029.
- Shu, Q and Gill, HS 2002, Immune protection mediated by the probiotic Lactobacillus rhamnosus HN001 (DR20) against Escherichia coli O157:H7 infection in mice, *FEMS immunology and medical microbiology*, 34, (1), pp. 59–64.
- Siciliano, SD, Laird, BD and Lemieux, CL 2010, Polycyclic aromatic hydrocarbons are enriched but bioaccessibility reduced in brownfield soils adhered to human hands, *Chemosphere*, 80, (9), pp. 1101–1108.
- Siegler, RL, Obrig, TG, Pysher, TJ, Tesh, VL, Denkers, ND and Taylor, FB 2003, Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome, *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 18, (2), pp. 92–96.
- Simrén, M, Barbara, G, Flint, HJ, Spiegel, BMR, Spiller, RC, Vanner, S, Verdu, EF, Whorwell, PJ, Zoetendal, EG and Rome Foundation Committee 2013, Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report, *Gut*, 62, (1), pp. 159–176.
- Sivieri, K, Bianchi, F, Tallarico, MA and Rossi, EA 2011, Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by probiotic Enterococcus faecium CRL 183, *Functional Foods in Health and Disease*, 1, (10), pp. 389–402.
- Sivieri, K, Morales, MLV, Adorno, MAT, Sakamoto, IK, Saad, SMI and Rossi, EA 2013, Lactobacillus acidophilus CRL 1014 improved 'gut health' in the SHIME reactor, *BMC gastroenterology*, 13, p. 100.
- Sivignon, A, de Vallée, A, Barnich, N, Denizot, J, Darcha, C, Pignède, G, Vandekerckove, P and Darfeuille-Michaud, A 2015, Saccharomyces cerevisiae CNCM I-3856 prevents colitis induced by AIEC bacteria in the transgenic mouse model mimicking Crohn's disease, *Inflammatory Bowel Diseases*, 21, (2), pp. 276–286.
- Smith, JL, Fratamico, PM and Gunther IV, NW 2013, Advances in Applied Microbiology, Academic Press.
- Stanley, TL, Ellermeier, CD and Slauch, JM 2000, Tissue-specific gene expression identifies a gene in the lysogenic phage Gifsy-1 that affects Salmonella enterica serovar Typhimurium survival in Peyer's patches, *Journal of bacteriology*, 182, (16), pp. 4406–4413.

- Stappenbeck, TS, Hooper, LV and Gordon, JI 2002, Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, (24), pp. 15451–15455.
- Stevens, MP and Frankel, GM 2014, The Locus of Enterocyte Effacement and Associated Virulence Factors of Enterohemorrhagic Escherichia coli, *Microbiology Spectrum*, 2, (4), pp. EHEC–0007–2013.
- Stirrup, V, Ledingham, SJ, Thomas, M, Pye, G and Evans, DF 1990, Redox potential measurement in the gastrointestinal-tract in man, *Gut*, 31, pp. A1171–A1171.
- Stolaki, M 2010, The human ileal microbiota and its function: development of a dynamic in vitro model for the human ileum, *Beneficial Microbes Conference*, p. 49.
- Sun, J, Zhou, T-T, Le, G-W and Shi, Y-H 2010, Association of Lactobacillus acidophilus with mice Peyer's patches, *Nutrition*, 26, (10), pp. 1008–1013.
- Surawicz, CM and Damman, C 2014, The Role of Probiotics in Prevention and Treatment of GI Infections, Intestinal Microbiota in Health and Disease: Modern Concepts, p. 165.
- Svensson, A, Larsson, A, Emtenäs, H, Hedenström, M, Fex, T, Hultgren, SJ, Pinkner, JS, Almqvist, F and Kihlberg, J 2001, Design and evaluation of pilicides: potential novel antibacterial agents directed against uropathogenic Escherichia coli, *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 2, (12), pp. 915–918.
- Swidsinski, A, Loening-Baucke, V, Kirsch, S and Doerffel, Y 2010, [Functional biostructure of colonic microbiota (central fermenting area, germinal stock area and separating mucus layer) in healthy subjects and patients with diarrhea treated with Saccharomyces boulardii], *Gastroentérologie Clinique Et Biologique*, 34 Suppl 1, pp. S79–92.
- Szalo, IM, Goffaux, F, Pirson, V, Piérard, D, Ball, H and Mainil, J 2002, Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) Escherichia coli of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains, *Research in Microbiology*, 153, (10), pp. 653–658.
- Szu, SC and Ahmed, A 2015, Clinical Studies of Escherichia coli O157:H7 Conjugate Vaccines in Adults and Young Children, in V Sperandio & CJ Hovde (eds), *Enterohemorrhagic Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing E. coli*, American Society of Microbiology, pp. 487–501.
- Szych, J, Wołkowicz, T, La Ragione, R and Madajczak, G 2014, Impact of antibiotics on the intestinal microbiota and on the treatment of Shiga-toxin-producing Escherichia coli and Salmonella infections, *Current Pharmaceutical Design*, 20, (28), pp. 4535–4548.

\mathcal{T}

- Takahashi, M, Taguchi, H, Yamaguchi, H, Osaki, T, Komatsu, A and Kamiya, S 2004, The effect of probiotic treatment with Clostridium butyricum on enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 infection in mice, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 41, (3), pp. 219–226.
- Takao, M, Yen, H and Tobe, T 2014, LeuO enhances butyrate-induced virulence expression through a positive regulatory loop in enterohaemorrhagic Escherichia coli, *Molecular Microbiology*, 93, (6), pp. 1302–1313.
- Tang, Y, Kim, H, Singh, AK, Aroonnual, A, Bae, E, Rajwa, B, Fratamico, PM and Bhunia, AK 2014, Light scattering sensor for direct identification of colonies of Escherichia coli serogroups O26, O45, O103, O111, O121, O145 and O157, *PloS One*, 9, (8), p. e105272.
- Tarr, PI, Gordon, CA and Chandler, WL 2005, Shiga-toxin-producing Escherichia coli and haemolytic uraemic syndrome, *Lancet (London, England)*, 365, (9464), pp. 1073–1086.
- Tarr, PI, Neill, MA, Clausen, CR, Watkins, SL, Christie, DL and Hickman, RO 1990, Escherichia coli 0157:H7 and the Hemolytic Uremic Syndrome: Importance of Early Cultures in Establishing the Etiology, *Journal* of Infectious Diseases, 162, (2), pp. 553–556.
- Tatsuno, I, Mundy, R, Frankel, G, Chong, Y, Phillips, AD, Torres, AG and Kaper, JB 2006, The lpf gene cluster for long polar fimbriae is not involved in adherence of enteropathogenic Escherichia coli or virulence of Citrobacter rodentium, *Infection and Immunity*, 74, (1), pp. 265–272.

- Terpend, K, Possemiers, S, Daguet, D and Marzorati, M 2013, Arabinogalactan and fructo-oligosaccharides have a different fermentation profile in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME ®), *Environmental Microbiology Reports*, 5, (4), pp. 595–603.
- Thanassi, DG, Cheng, LW and Nikaido, H 1997, Active efflux of bile salts by Escherichia coli, *Journal of Bacteriology*, 179, (8), pp. 2512–2518.
- Thévenot, J, Etienne-Mesmin, L, Denis, S, Chalancon, S, Alric, M, Livrelli, V and Blanquet-Diot, S 2013, Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 Survival in an In Vitro Model of the Human Large Intestine and Interactions with Probiotic Yeasts and Resident Microbiota, *Applied and Environmental Microbiology*, 79, (3), pp. 1058–1064.
- Tiago, FCP, Martins, FS, Souza, ELS, Pimenta, PFP, Araujo, HRC, Castro, IM, Brandão, RL and Nicoli, JR 2012, Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by Saccharomyces probiotics, *Journal of Medical Microbiology*, 61, (Pt 9), pp. 1194–1207.
- Tiago, FC, Sousa, LP, Araújo, HR, Pimenta, PF, Bonjardim, CA, Nicoli, JR and Teixeira, MM 2013, Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as ones of the protective mechanisms of Saccharomyces boulardii against Salmonella infection in mice, *Microbes and Infection*, 20, p. 1e10.
- Ting, Y, Jiang, Y, Lan, Y, Xia, C, Lin, Z, Rogers, MA and Huang, Q 2015, Viscoelastic Emulsion Improved the Bioaccessibility and Oral Bioavailability of Crystalline Compound: A Mechanistic Study Using in Vitro and in Vivo Models, *Molecular Pharmaceutics*, 12, (7), pp. 2229–2236.
- Tkalcic, S, Zhao, T, Harmon, BG, Doyle, MP, Brown, CA and Zhao, P 2003, Fecal shedding of enterohemorrhagic Escherichia coli in weaned calves following treatment with probiotic Escherichia coli, *Journal of Food Protection*, 66, (7), pp. 1184–1189.
- Tobe, T, Nakanishi, N and Sugimoto, N 2011, Activation of Motility by Sensing Short-Chain Fatty Acids via Two Steps in a Flagellar Gene Regulatory Cascade in Enterohemorrhagic Escherichia coli, *Infection and Immunity*, 79, (3), pp. 1016–1024.
- Toma, C, Higa, N, Iyoda, S, Rivas, M and Iwanaga, M 2006, 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, (2), pp. 153–161.
- Toma, C, Martínez Espinosa, E, Song, T, Miliwebsky, E, Chinen, I, Iyoda, S, Iwanaga, M and Rivas, M 2004, Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing Escherichia coli, *Journal of Clinical Microbiology*, 42, (11), pp. 4937–4946.
- Torres, AG, Giron, JA, Perna, NT, Burland, V, Blattner, FR, Avelino-Flores, F and Kaper, JB 2002, Identification and Characterization of lpfABCC'DE, a Fimbrial Operon of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7, *Infection and Immunity*, 70, (10), pp. 5416–5427.
- Torres, AG, Kanack, KJ, Tutt, CB, Popov, V and Kaper, JB 2004, Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of Escherichia coli O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic E. coli strains, *FEMS microbiology letters*, 238, (2), pp. 333–344.
- Torres, AG, Zhou, X and Kaper, JB 2005, Adherence of diarrheagenic Escherichia coli strains to epithelial cells, *Infection and Immunity*, 73, (1), pp. 18–29.
- Torres, AG, López-Sánchez, GN, Milflores-Flores, L, Patel, SD, Rojas-López, M, Martínez de la Peña, CF, Arenas-Hernández, MMP and Martínez-Laguna, Y 2007, Ler and H-NS, regulators controlling expression of the long polar fimbriae of Escherichia coli O157:H7, *Journal of Bacteriology*, 189, (16), pp. 5916–5928.
- Torres, AG, Slater, TM, Patel, SD, Popov, VL and Arenas-Hernández, MMP 2008, Contribution of the Ler- and H-NS-Regulated Long Polar Fimbriae of Escherichia coli O157:H7 during Binding to Tissue-Cultured Cells, *Infection and Immunity*, 76, (11), pp. 5062–5071.
- Torres, AG, Blanco, M, Valenzuela, P, Slater, TM, Patel, SD, Dahbi, G, López, C, Barriga, XF, Blanco, JE, Gomes, TAT, Vidal, R and Blanco, J 2009, Genes Related to Long Polar Fimbriae of Pathogenic Escherichia coli Strains as Reliable Markers To Identify Virulent Isolates, *Journal of Clinical Microbiology*, 47, (8), pp. 2442–2451.
- Torres-Escribano, S, Denis, S, Blanquet-Diot, S, Calatayud, M, Barrios, L, Vélez, D, Alric, M and Montoro, R 2011, Comparison of a static and a dynamic in vitro model to estimate the bioaccessibility of As, Cd, Pb

and Hg from food reference materials Fucus sp.(IAEA-140/TM) and Lobster hepatopancreas (TORT-2), *Science of the total environment*, 409, (3), pp. 604–611.

- Tortora, GJ and Grabowski, SR 1994, Principes d'anatomie et de physiologie, De Boeck Université.
- Toshima, H, Hachio, M, Ikemoto, Y, Ogasawara, J, Hase, A, Takahashi, K, Masaki, H and Nishikawa, Y 2007, Prevalence of enteric bacteria that inhibit growth of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157 in humans, *Epidemiology and Infection*, 135, (1), pp. 110–117.
- Toshima, H, Yoshimura, A, Arikawa, K, Hidaka, A, Ogasawara, J, Hase, A, Masaki, H and Nishikawa, Y 2007, Enhancement of Shiga Toxin Production in Enterohemorrhagic Escherichia coli Serotype O157:H7 by DNase Colicins, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, (23), pp. 7582–7588.
- Tracy, BP, Gaida, SM and Papoutsakis, ET 2010, Flow cytometry for bacteria: enabling metabolic engineering, synthetic biology and the elucidation of complex phenotypes, *Current Opinion in Biotechnology*, 21, (1), pp. 85–99.
- Tran, S-L, Billoud, L, Lewis, SB, Phillips, AD and Schüller, S 2014, Shiga toxin production and translocation during microaerobic human colonic infection with Shiga toxin-producing E. coli O157:H7 and O104:H4, *Cellular Microbiology*, 16, (8), pp. 1255–1266.
- Truchado, P, Van den Abbeele, P, Rivière, A, Possemiers, S, De Vuyst, L and Van de Wiele, T 2015, Bifidobacterium longum D2 enhances microbial degradation of long-chain arabinoxylans in an in vitro model of the proximal colon, *Beneficial Microbes*, 6, (6), pp. 849–860.
- Turková, K, Mavrič, A, Narat, M, Rittich, B, Spanová, A, Rogelj, I and Matijašić, BB 2013, Evaluation of Lactobacillus strains for selected probiotic properties, *Folia Microbiologica*, 58, (4), pp. 261–267.
- Turnbaugh, PJ and Gordon, JI 2009, The core gut microbiome, energy balance and obesity, *The Journal of Physiology*, 587, (Pt 17), pp. 4153–4158.
- Turpin, W, Humblot, C, Thomas, M and Guyot, J-P 2010, Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms, *International Journal of Food Microbiology*, 143, (3), pp. 87–102.

U

Ulinski, T 2013, Le syndrome hémolytique et urémique à STEC - Traitement et perspectives, Journée Parisienne de Pédiatrie.

\mathcal{V}

- Van den Abbeele, P, Grootaert, C, Marzorati, M, Possemiers, S, Verstraete, W, Gérard, P, Rabot, S, Bruneau, A, El Aidy, S, Derrien, M, Zoetendal, E, Kleerebezem, M, Smidt, H and Van de Wiele, T 2010, Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific, and selective for Bacteroidetes and Clostridium cluster IX, *Applied and Environmental Microbiology*, 76, (15), pp. 5237– 5246.
- Van den Abbeele, P, Grootaert, C, Possemiers, S, Verstraete, W, Verbeken, K and Van de Wiele, T 2009, In vitro model to study the modulation of the mucin-adhered bacterial community, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, (2), pp. 349–359.
- Van den Abbeele, P, Roos, S, Eeckhaut, V, MacKenzie, DA, Derde, M, Verstraete, W, Marzorati, M, Possemiers, S, Vanhoecke, B, Van Immerseel, F and others 2012, Incorporating a mucosal environment in a dynamic gut model results in a more representative colonization by lactobacilli, *Microbial biotechnology*, 5, (1), pp. 106–115.
- Van den Abbeele, P, Venema, K, Van de Wiele, T, Verstraete, W and Possemiers, S 2013, Different human gut models reveal the distinct fermentation patterns of Arabinoxylan versus inulin, *Journal of Agricultural* and Food Chemistry, 61, (41), pp. 9819–9827.

- Van de Wiele, T, Gallawa, CM, Kubachka, KM, Creed, JT, Basta, N, Dayton, EA, Whitacre, S, Du Laing, G and Bradham, K 2010, Arsenic metabolism by human gut microbiota upon in vitro digestion of contaminated soils, *Environmental Health Perspectives*, 118, (7), pp. 1004–1009.
- Vanhaecke, L, Grootaert, C, Verstraete, W and Van de Wiele, T 2009, Chemopreventive effects from prebiotic inulin towards microbial 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine bioactivation, *Journal of Applied Microbiology*, 106, (2), pp. 474–485.
- Vanhoutte, T, De Preter, V, De Brandt, E, Verbeke, K, Swings, J and Huys, G 2006, Molecular monitoring of the fecal microbiota of healthy human subjects during administration of lactulose and Saccharomyces boulardii, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, (9), pp. 5990–5997.
- Van Loo-Bouwman, CA, Naber, THJ, Minekus, M, van Breemen, RB, Hulshof, PJM and Schaafsma, G 2014, Food matrix effects on bioaccessibility of β-carotene can be measured in an in vitro gastrointestinal model, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, (4), pp. 950–955.
- Van Wey, AS, Cookson, AL, Roy, NC, McNabb, WC, Soboleva, TK, Wieliczko, RJ and Shorten, PR 2014, A mathematical model of the effect of pH and food matrix composition on fluid transport into foods: An application in gastric digestion and cheese brining, *Food Research International*, 57, pp. 34–43.
- Vareille, M, de Sablet, T, Hindré, T, Martin, C and Gobert, AP 2007, Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic Escherichia coli, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, (24), pp. 10199–10204.
- Vazeille, E, Chassaing, B, Buisson, A, Dubois, A, de Vallée, A, Billard, E, Neut, C, Bommelaer, G, Colombel, J-F, Barnich, N, Darfeuille-Michaud, A and Bringer, M-A 2015, GipA Factor Supports Colonization of Peyer's Patches by Crohn's Disease-associated Escherichia Coli, *Inflammatory Bowel Diseases*.
- Venema, K and Van den Abbeele, P 2013, Experimental models of the gut microbiome, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27, (1), pp. 115–126.
- Venugopalan, V, Shriner, KA and Wong-Beringer, A 2010, Regulatory oversight and safety of probiotic use, *Emerging Infectious Diseases*, 16, (11), pp. 1661–1665.
- Vergara, AF, Vidal, RM, Torres, AG and Farfan, MJ 2014, Long polar fimbriae participates in the induction of neutrophils transepithelial migration across intestinal cells infected with enterohemorrhagic E. coli O157:H7, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 4, p. 185.
- Vermeiren, J, Marzorati, M, Possemiers, S and Van de Wiele, T 2011, The Gut Microbiota as Target for Innovative Drug Development: Perspectives and a Case Study of Inflammatory Bowel Diseases, INTECH Open Access Publisher.
- Vermeiren, J, Van den Abbeele, P, Laukens, D, Vigsnaes, LK, De Vos, M, Boon, N and Van de Wiele, T 2012, Decreased colonization of fecal Clostridium coccoides/Eubacterium rectale species from ulcerative colitis patients in an in vitro dynamic gut model with mucin environment, *FEMS microbiology ecology*, 79, (3), pp. 685–696.
- Vermeiren, J, Van de Wiele, T, Van Nieuwenhuyse, G, Boeckx, P, Verstraete, W and Boon, N 2012, Sulfide- and nitrite-dependent nitric oxide production in the intestinal tract, *Microbial Biotechnology*, 5, (3), pp. 379– 387.
- Vigsnaes, LK, van den Abbeele, P, Sulek, K, Frandsen, HL, Steenholdt, C, Brynskov, J, Vermeiren, J, van de Wiele, T and Licht, TR 2013, Microbiotas from UC patients display altered metabolism and reduced ability of LAB to colonize mucus, *Scientific Reports*, 3, p. 1110.
- Villemejane, C, Wahl, R, Aymard, P, Denis, S and Michon, C 2015, In vitro digestion of short-dough biscuits enriched in proteins and/or fibres, using a multi-compartmental and dynamic system (1): viscosity measurement and prediction, *Food Chemistry*, 182, pp. 55–63.

W

Wagner, PL, Neely, MN, Zhang, X, Acheson, DW, Waldor, MK and Friedman, DI 2001, Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic Escherichia coli strain, *Journal of Bacteriology*, 183, (6), pp. 2081–2085.

- Wagner, PL and Waldor, MK 2002, Bacteriophage control of bacterial virulence, *Infection and Immunity*, 70, (8), pp. 3985–3993.
- Waldor, MK and Friedman, DI 2005, Phage regulatory circuits and virulence gene expression, Current Opinion in Microbiology, 8, (4), pp. 459–465.
- Walker, AW, Duncan, SH, Louis, P and Flint, HJ 2014, Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota, *Trends in Microbiology*, 22, (5), pp. 267–274.
- Walter, J and Ley, R 2011, The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent Evolutionary Changes, *Annual Review of Microbiology*, 65, (1), pp. 411–429.
- Walters, M and Sperandio, V 2006, Quorum sensing in Escherichia coli and Salmonella, International journal of medical microbiology: IJMM, 296, (2-3), pp. 125–131.
- Wang, X, Heazlewood, S p., Krause, D o. and Florin, T h. j. 2003, Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis, *Journal of Applied Microbiology*, 95, (3), pp. 508–520.
- Wen, SX, Teel, LD, Judge, NA and O'Brien, AD 2006, A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* of America, 103, (18), pp. 7082–7087.
- Willford, J, Mills, K and Goodridge, LD 2009, Evaluation of three commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of Shiga toxin, *Journal of Food Protection*, 72, (4), pp. 741–747.
- Wilson, CG 2010, The transit of dosage forms through the colon, *International Journal of Pharmaceutics*, 395, (1–2), pp. 17–25.
- Woda, A, Mishellany-Dutour, A, Batier, L, François, O, Meunier, J-P, Reynaud, B, Alric, M and Peyron, M-A 2010, Development and validation of a mastication simulator, *Journal of Biomechanics*, 43, (9), pp. 1667–1673.
- Wong, ARC, Pearson, JS, Bright, MD, Munera, D, Robinson, KS, Lee, SF, Frankel, G and Hartland, EL 2011, Enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli: even more subversive elements, *Molecular Microbiology*, 80, (6), pp. 1420–1438.
- Wong, CS, Jelacic, S, Habeeb, RL, Watkins, SL and Tarr, PI 2000, The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of Escherichia coli O157:H7 infections, *The New England Journal of Medicine*, 342, (26), pp. 1930–1936.
- Woodmansey, EJ, McMurdo, MET, Macfarlane, GT and Macfarlane, S 2004, Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotictreated elderly subjects, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, (10), pp. 6113–6122.
- Worametrachanon, S, Apichartsrangkoon, A, Chaikham, P, Van den Abbeele, P, Van de Wiele, T and Wirjantoro, TI 2014, Effect of encapsulated Lactobacillus casei 01 along with pressurized-purple-rice drinks on colonizing the colon in the digestive model, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, (11), pp. 5241–5250.
- Worsöe, J, Fynne, L, Gregersen, T, Schlageter, V, Christensen, LA, Dahlerup, JF, Rijkhoff, NJM, Laurberg, S and Krogh, K 2011, Gastric transit and small intestinal transit time and motility assessed by a magnet tracking system, *BMC gastroenterology*, 11, p. 145.
- Wragg, J, Cave, M, Basta, N, Brandon, E, Casteel, S, Denys, S, Gron, C, Oomen, A, Reimer, K, Tack, K and Van de Wiele, T 2011, An inter-laboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil, *The Science of the Total Environment*, 409, (19), pp. 4016–4030.
- Wu, GD, Chen, J, Hoffmann, C, Bittinger, K, Chen, Y-Y, Keilbaugh, SA, Bewtra, M, Knights, D, Walters, WA, Knight, R, Sinha, R, Gilroy, E, Gupta, K, Baldassano, R, Nessel, L, Li, H, Bushman, FD and Lewis, JD 2011, Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes, *Science (New York, N.Y.)*, 334, (6052), pp. 105–108.

У

- Yamasaki, C, Natori, Y, Zeng, XT, Ohmura, M, Yamasaki, S, Takeda, Y and Natori, Y 1999, Induction of cytokines in a human colon epithelial cell line by Shiga toxin 1 (Stx1) and Stx2 but not by non-toxic mutant Stx1 which lacks N-glycosidase activity, *FEBS letters*, 442, (2-3), pp. 231–234.
- Yang, B, Feng, L, Wang, F and Wang, L 2015, Enterohemorrhagic Escherichia coli senses low biotin status in the large intestine for colonization and infection, *Nature Communications*, 6, p. 6592.
- Yang, L, Wu, L, Zhu, S, Long, Y, Hang, W and Yan, X 2010, Rapid, absolute, and simultaneous quantification of specific pathogenic strain and total bacterial cells using an ultrasensitive dual-color flow cytometer, *Analytical Chemistry*, 82, (3), pp. 1109–1116.
- Yatsunenko, T, Rey, FE, Manary, MJ, Trehan, I, Dominguez-Bello, MG, Contreras, M, Magris, M, Hidalgo, G, Baldassano, RN, Anokhin, AP, Heath, AC, Warner, B, Reeder, J, Kuczynski, J, Caporaso, JG, Lozupone, CA, Lauber, C, Clemente, JC, Knights, D, Knight, R and Gordon, JI 2012, Human gut microbiome viewed across age and geography, *Nature*, 486, (7402), pp. 222–227.
- Yin, N, Zhang, Z, Cai, X, Du, H, Sun, G and Cui, Y 2015, In Vitro Method To Assess Soil Arsenic Metabolism by Human Gut Microbiota: Arsenic Speciation and Distribution, *Environmental Science & Technology*, 49, (17), pp. 10675–10681.
- Yin, X, Feng, Y, Lu, Y, Chambers, JR, Gong, J and Gyles, CL 2012, Adherence and associated virulence gene expression in acid-treated Escherichia coli O157 : H7 in vitro and in ligated pig intestine, *Microbiology* (*Reading, England*), 158, (Pt 4), pp. 1084–1093.
- Yuen, K-H 2010, The transit of dosage forms through the small intestine, *International Journal of Pharmaceutics*, 395, (1–2), pp. 9–16.
- Yuk, H-G and Marshall, DL 2004, Adaptation of Escherichia coli O157:H7 to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid acid, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, (6), pp. 3500–3505.
- Yu, Y-X, Li, J-L, Zhang, X-Y, Yu, Z-Q, Van de Wiele, T, Han, S-Y, Wu, M-H, Sheng, G-Y and Fu, J-M 2010, Assessment of the bioaccessibility of polybrominated diphenyl ethers in foods and the correlations of the bioaccessibility with nutrient contents, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, (1), pp. 301– 308.

Z

- Zanello, G, Berri, M, Dupont, J, Sizaret, P-Y, D'Inca, R, Salmon, H and Meurens, F 2011, Saccharomyces cerevisiae Modulates Immune Gene Expressions and Inhibits ETEC-Mediated ERK1/2 and p38 Signaling Pathways in Intestinal Epithelial Cells, *PLoS ONE*, 6, (4).
- Zeilmaker, MJ, Bakker, MI, Schothorst, R and Slob, W 2010, Risk assessment of N-nitrosodimethylamine formed endogenously after fish-with-vegetable meals, *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society* of *Toxicology*, 116, (1), pp. 323–335.
- Zeinhom, M, Tellez, AM, Delcenserie, V, El-Kholy, AM, El-Shinawy, SH and Griffiths, MW 2012, Yogurt containing bioactive molecules produced by Lactobacillus acidophilus La-5 exerts a protective effect against enterohemorrhagic Escherichia coli in mice, *Journal of Food Protection*, 75, (10), pp. 1796–1805.
- Zhang, X, McDaniel, AD, Wolf, LE, Keusch, GT, Waldor, MK and Acheson, DW 2000, Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice, *The Journal of Infectious Diseases*, 181, (2), pp. 664–670.
- Zhang, Z, Geng, J, Tang, X, Fan, H, Xu, J, Wen, X, Ma, Z (Sam) and Shi, P 2014, Spatial heterogeneity and cooccurrence patterns of human mucosal-associated intestinal microbiota, *The ISME Journal*, 8, (4), pp. 881–893.
- Zhao, B and Houry, WA 2010, Acid stress response in enteropathogenic gammaproteobacteria: an aptitude for survivalThis paper is one of a selection of papers published in this special issue entitled "Canadian Society

of Biochemistry, Molecular & Cellular Biology 52nd Annual Meeting — Protein Folding: Principles and Diseases" and has undergone the Journal's usual peer review process., *Biochemistry and Cell Biology*, 88, (2), pp. 301–314.

Zoetendal, EG, von Wright, A, Vilpponen-Salmela, T, Ben-Amor, K, Akkermans, ADL and de Vos, WM 2002, Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, (7), pp. 3401–3407.

ANNEXES

PROPRIÉTÉS D'ADHÉSION DES EHEC AUX CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES

Afin de mieux comprendre les premières étapes du processus physiopathologique des infections à EHEC, les capacités d'adhésion à différentes lignées de cellules épithéliales intestinales d'une collection de souches établie par l'équipe M2iSH ont été testées dans des modèles *in vitro*. Nous disposons de 256 souches STEC / EHEC isolées chez l'homme, dans les aliments ou à partir de matières fécales bovines. Les tests d'adhésion *in vitro* ont été effectués sur trois lignées cellulaires couramment utilisées : T84 (carcinome de côlon humain), HCT-8 (carcinome iléo-caecal humain) et HEp-2 (carcinome de larynx humain). Seulement 18% des souches de la collection sont adhérentes dans nos modèles, et les niveaux d'adhésion sont globalement faibles par comparaison avec les souches enteropathogènes de référence. Il est intéressant de noter que 51% des souches EHEC isolées chez l'homme, 34% de celles issues des aliments et seulement 8% des souches du seropathotype B sont les plus adhérentes.

Aucun lien n'a cependant pu être mis en évidence entre la capacité d'adhésion aux lignées cellulaires testées et le pouvoir pathogène : certaines souches pathogènes de sérotype O157:H7 (seropathotype A) présentent des niveaux d'adhésion très faibles, alors que des souches hautement adhérentes appartiennent à des sérotypes qui ne sont jamais isolés en situation pathogène chez l'homme (seropathotype E). Tous les isolats ont été analysés pour la présence de gènes codant pour des facteurs supposés impliqués dans les mécanismes d'adhésion. Seuls les gènes *eae* et *Tox*B ont été clairement associés à l'adhésion sur les lignées cellulaires testées.

Notre travail a permis de montrer que les tests d'adhésion *in vitro* ne constituent pas un outil pertinent pour évaluer la virulence et la capacité à provoquer des épidémies des STEC, et ne reflètent probablement pas les interactions moléculaires qui se produisent *in vivo*. Développer des modèles appropriés pour étudier les mécanismes de colonisation est une étape indispensable à la conception de nouvelles approches thérapeutiques vis-à-vis des infections à EHEC.

Les travaux réalisés sur les propriétés d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales ont fait l'objet d'une publication internationale.

PUBLICATION N°5

In vitro adhesion properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and humans

2015 – Frontiers in microbiology – Impact factor₂₀₁₅ : 4.165)

Nathalie PRADEL, Lucie ETIENNE-MESMIN, Jonathan THÉVENOT, <u>Charlotte CORDONNIER</u>, Stéphanie BLANQUET-DIOT et Valérie LIVRELLI


In vitro adhesion properties of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from cattle, food, and humans

Nathalie Pradel^{1†}, Lucie Etienne-Mesmin^{1,2}, Jonathan Thévenot^{1,2}, Charlotte Cordonnier^{1,2}, Stéphanie Blanquet-Diot² and Valérie Livrelli^{1,3}*

¹ Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, M2iSH, 'Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte' UMR INSERM/Université d'Auvergne U1071 USC-INRA 2018, Clermont Université – Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France

² Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, EA-4678 CIDAM, 'Conception Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament', Clermont Université – Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France

³ Unité de Recherche M2iSH, Faculté de Pharmacie, CHU Clermont-Ferrand, Service Bactériologie Mycologie Parasitologie, Clermont-Ferrand, France

Edited by:

Christina Maria Joseph Elisabeth Vandenbroucke-Grauls, VU University Medical Center, Netherlands

Reviewed by:

Polly Leung, The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong Kerry Cooper, United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service, USA

*Correspondence:

Valérie Livrelli, Unité de Recherche M2iSH, Faculté de Pharmacie, CHU Clermont-Ferrand, Service Bactériologie Mycologie Parasitologie, 28 Place Henri-Dunant, 63 001 Clermont-Ferrand, France e-mail: valerie.livrelli@udamail.fr

[†]Present address:

Nathalie Pradel, Aix Marseille Université, IRD, CNRS, Mediterranean Institute of Oceanography, UM 110, 13288 Marseille, France

INTRODUCTION

Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) can be associated with human diseases, ranging from uncomplicated diarrhea to hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic-uremic syndrome (HUS; Hussein, 2007). Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) constitute a subset of pathogenic STEC that also contain the LEE (Clements et al., 2012). The most prominent serotype within the EHEC group is O157:H7 (Paton and Paton, 1998). STEC food-borne infections, either outbreaks or sporadic cases, appear worldwide.

As example, an outbreak with 1000s cases of food-borne illness has been caused by an emerging atypical O104:H4 Stx-producing pathogen in 2011 in Germany (Bielaszewska et al., 2011; Frank et al., 2011; Clements et al., 2012; Trachtman et al., 2012). Several studies have shown a high prevalence of STEC belonging to a wide range of serotypes in animals and food products (Pradel et al., 2000; Beutin, 2006; Hussein, 2007). However, only a limited number of serotypes have been associated with human disease, among which O157:H7 is predominant (Rangel et al., 2005). The association of serotypes with disease of varying severity in humans, and with outbreaks or sporadic disease, has led to the proposal that STEC be classified into five seropathotypes: A (the most virulent O157:H7 serotype), B (associated with outbreaks and HUS

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are able to cause serious illnesses ranging from diarrhea to hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome (HUS). These bacteria colonize the digestive tract of humans and produce Shiga-toxins, which are considered to be essential for virulence and are crucial in lethal infection. Colon colonization is supposed to be a determinant step in the development of the infection, but the virulence traits that mediate this step are unclear. We analyzed the ability of 256 STEC strains belonging to seropathotype A (the most virulent O157:H7 serotype) to seropathotype E (not involved in human disease) to adhere to HEp-2, HCT-8, and T84 cell lines. Of the 256 STEC tested most (82%) were non-adherent in our assays. The adhesion levels were globally low and were not related to pathogenicity, although the highest levels were associated to O26:H11 and O103:H2 strains of seropathotype B (associated with HUS but less commonly than serotype O157:H7), possessing both the *eae* and *toxB* genes.

Keywords: STEC, cell lines adhesion, seropathotype, eae, toxB

but less commonly than serotype O157:H7), C (associated with sporadic HUS but not typically with outbreaks), D (associated with diarrhea but not with outbreaks or HUS), and E (serotypes that have not been involved in disease in humans; Karmali et al., 2003). STEC colonize the digestive tract of humans and produce Stx1 and/or Stx2 which are essential for virulence. Different combinations of potential pathogenicity factors have been observed in clinical isolates, in addition to the production of Stx (Paton and Paton, 1998; Girardeau et al., 2005; Pradel et al., 2008). However, the known virulence factors do not allow differentiation of STEC strains with a high pathogenic potential from their counterparts of lesser clinical significance.

The terminal ileum and the colon are supposed to be the main sites of EHEC colonization in humans, whereas in cattle, the terminal recto-anal junction is thought to be the primary site of colonization of the bovine gastrointestinal tract (Naylor et al., 2003; Chong et al., 2007; Mahajan et al., 2009). Some STEC strains adhere to epithelial cells in a histopathological lesion pattern known as attaching and effacing (A/E) adhesion, first described in enteropathogenic *E. coli* (EPEC), characterized by the effacement of microvilli and the formation of actin pedestals, and involving intimin EaeA (Hayward et al., 2006). *In vitro* adherence of STEC strains has been examined using different epithelial cell lines under a range of experimental conditions. The "gold standard" method was originally described to analyze virulence properties of *E. coli* strains involved in diarrhea (Knutton et al., 1989). The HEp-2 or HCT-8 cell assay is considered as a suitable model to study A/E lesions in STEC (McKee and O'Brien, 1995). The human intestinal T84 cell line is also used for studies of the adhesion properties since these cells resemble human colonic epithelial cells, which are thought to be the *in vivo* target cells for STEC infection (Winsor et al., 1992; Li et al., 1999). However, not all the pathogenic STEC strains are able to adhere in an A/E mechanism. Thus, the virulence traits that mediate STEC colonization are not fully understood.

In this study, the adhesion properties of a collection of 256 STEC strains (belonging to seropathotypes A to E), isolated from humans, foods, or animals, were analyzed using *in vitro* adhesion tests to human epithelial cell lines (HEp-2, HCT-8, T84) and relationships between adhesion, virulence factors, and pathogenicity were investigated.

MATERIALS AND METHODS

BACTERIAL STRAINS

The distribution according to origin and seropathotype of the 256 STEC isolates tested in this study is given in **Table 1**. Among the 256 STEC strains, 32 were isolated from patients suffering from HUS or HC, 187 were isolated from bovine feces, 26 from food samples, and 11 from asymptomatic children (Pradel et al., 2000, 2002). EHEC O157:H7 strains EDL933 (ATCC 43895) and 86-24 (Tarr et al., 1989), and EPEC strain E2348/69 were used as references strains. *E. coli* strain K-12 C600 was used as a negative control. Bacteria were stored in Luria broth (LB), with 10% glycerol at -80° C. Unless otherwise stated, the strains were grown overnight at 37°C in LB.

CELL LINE AND CELL CULTURE

The human laryngeal epithelioma cell line HEp-2 (ATCC CCL-23; American Type Culture Collection, USA), the human ileocecal carcinoma cell line HCT-8 (ATCC CCL-244), and the human colonic carcinoma cell line T84 (ATCC CCL-248) were used for investigating STEC adhesion profiles. The three cell lines were grown with

 Table 1 | Number of strains analyzed in this study according to origin and seropathotype.

				Ser	opath	otyp	es	
		A	В	С	D	Е	ND	Total
	Number of serotypes	1	2	19	22	49	_	93
Origin	Patients (HUS, HC)	10	8	10	0	0	4	32
	Bovine feces	1	2	57	37	79	11	187
	Food	2	0	6	4	11	3	26
	Asymptomatic children	0	2	0	9	0	0	11
	Total	13	12	73	50	90	18	256

HUS, hemolytic-uremic syndrome; HC, hemorrhagic colitis; ND, not determined.

ADHESION ASSAYS

The bacterial strains were grown for 3 h (exponential growth phase) or 18 h (late growth phase) at 37°C before infection, in LB or in Cell Culture Medium (CCM) with 50% HAM-50% DMEM. Bacteria were harvested by centrifugation at 7000 \times g for 10 min and suspended in CCM in the presence of 1% α-Dmannoside to a final concentration of 108 CFU per ml, which was checked by plating on LB agar for each inoculum. The culture cells were washed three times with PBS pH 7.4 and then infected with 10⁸ bacteria for 3 h at 37°C at a multiplicity of infection (MOI) of 100. After 3 h, non-adherent (NA) bacteria were removed from the cells by three washes with PBS. Bacterial adherence patterns were examined with phase-contrast microscopy after Giemsa staining. For quantitative adherence assays, the cells were gently scraped off with 1% triton X-100 (Sigma) in PBS, and serial 10-fold dilutions were plated overnight at 37°C onto Luria agar plates. Each experiment was repeated at least three times. Variations in the level of F-actin in HEp-2 and HCT-8 cells were estimated by fluorescence actin staining (FAS) assay (Knutton et al., 1989). Scanning electron microscopy (SEM) was performed as previously described by Xicohtencatl-Cortes et al. (2007).

DETECTION OF GENES ASSOCIATED WITH ADHESION

All STEC isolates were analyzed for the presence of genes encoding for EaeA, EfaI, ToxB, LpfA, Saa, East1, EspP, and Iha. The corresponding *eae*, *efa1*, *toxB*, *lpf*, *saa*, *astA*, *espP*, and *iha* genes were amplified using primers listed in **Table 2**. The presence of the genes was determined directly by PCR and/or by colony blot hybridization using probes labeled with α -³²P-dCTP, as described previously (Pradel et al., 2002).

STATISTICAL ANALYSIS

The data were analyzed with Epi Info version 6.02 by the χ^2 test, except for the variable needing a two-tailed Fischer exact test. The Student *t*-test for unpaired data was used at the 5% level of significance for the comparison of values.

RESULTS

QUANTITATIVE ADHESION OF 17 STEC STRAINS TO THE T84 CELL LINE

Different bacterial growth phases (exponential growth phase vs. late-log phase), and types of bacterial culture media (LB vs. CCM) were tested in preliminary infection experiments on the T84 human colonic carcinoma cell line. These assays were performed with two virulent STEC strains (O157:H7 strain EDL933 and O91:H21 strain CH014), the EPEC reference strain (E2348/69) as a positive control, and the *E. coli* strain K-12 C600 as a negative control (**Figure 1**). The best adhesion levels were obtained with strains grown for 3 h in CCM. For further quantitative experiments, we thus chose to incubate the bacteria for 3 h at 37°C

Target Gene	Primer name	Reference	Oligonucleotide sequence	Number of positive strains
			(5′ to 3′)	(out of 256 strains)
eae	eaeF3	Pradel et al. (2008)	GAACGGCAGAGGTTAATCTGC	38 (15%)
	eaeR3		TCAATGAAGACGTTATAGCCC	
efa1	88AT	Nicholls et al. (2000)	AAGGTGTTACAGAGATTA	28 (11%)
	88TN		TGAGGCGGCAGGATAGTT	
toxB	Tox1	Paton and Paton (1998)	ATCCTGAAACAAAACGAAACG	27 (10%)
	Tox2		AATTGTATGCTCTAGACTCC	
lpfA _{O113}	lpfA-F	Doughty et al. (2002)	ATGAAGCGTAATATTATAG	201 (79%)
	<i>lpfA</i> -R		TTATTTCTTATATTCGAC	
<i>lpfA</i> _{0157/01-141}	lpf0141-F	Szalo et al. (2002)	CTGCGCATTGCCGTAAC	
	lpf0141-R		ATTTACAGGCGAGATCGTG	
<i>lpfA</i> _{O157/OI-154}	O154-FCT	Toma et al. (2004)	GCAGGTCACCTACAGGCGGC	
	O154-RCT		CTGCGAGTCGGCGTTAGCTG	
saa	SaaDF	Nicholls et al. (2000)	CGTGATGAACAGGCTATTGC	82 (32%)
	<i>Saa</i> DR		ATGGACATGCCTGTGGCAAC	
astA	east11a	Yamamoto et al. (1997)	CCATCAACACAGTATATCCGA	20 (8%)
	east11b		GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	
espP	espA	Pradel et al. (2008)	AAACAGCAGGCACTTGAACG	122 (48%)
	espB		GGAGTCGTCAGTCAGTAGAT	
iha	<i>iha</i> -F	Tarr et al. (2000)	CTGGCATGCCGAGGCAGTGC	169 (66%)
	<i>iha</i> -R		CGTTGCCACTGTTCCGCCAGG	

Table 2 Primers used fo	r genes targeting an	d proportion of positive strain
---------------------------	----------------------	---------------------------------

in CCM before infection. Quantitative experiments, performed on 17 STEC strains isolated from human cases, indicated that the number of bacteria adhering to the T84 cells was between 2.4×10^3 and 4.4×10^5 CFU/well (**Figure 2A**). The number reached 2×10^6 CFU/well for the EPEC reference strain, indicating that STEC adhered to very low levels compared to the EPEC strain, and just above the level of the negative control C600. Adherence patterns were investigated after staining with Giemsa and by SEM observations. The STEC strains adhered sparsely, whereas the EPEC formed micro-colonies (**Figure 2B**).

ADHESION PROPERTIES OF 256 STEC TO THE HCT-8 AND HEP-2 CELL LINES

Since very low levels of adhesion were observed with the pathogenic STEC tested on T84 cells, we chose to analyze the 17 STEC strains and 239 additional STEC strains of diverse origins on two cell lines commonly used for *in vitro* adhesion assays: HCT-8 (from human ileocecal carcinoma), and HEp-2 (from human larynx carcinoma) cell lines (**Figure 3**). We considered as adherent the strains adhering to at least one of the two cell lines. Adhesion to HCT-8 or HEp-2 showed few strains efficiently adhering over a 3 h course of infection: among the 256 STEC strains, 209 (82%) were considered as NA; (i.e., less than 1 bacterium per cell; **Figure 3A**). Only 18% (47/256) of the strains adhered to at least one of the cell lines. Among them, 31 adhered both to HEp-2 and to HCT-8.

The great majority of STEC strains were NA whatever the seropathotype (A: 61% NA, C: 84% NA, D: 84% NA, E: 91% NA),

except for the seropathotype B for which all the strains tested were adherent (**Figure 3B**). The adherent strains belonging to seropathotype A were associated to a low level of adhesion (+, 1 to 5 bacteria per cell; Fisher, P = 0.01), and the seropathotype B was associated to the higher level of adhesion (+++, more than 20 bacteria per cell; Fisher, P = 0.002; **Figure 3B**; **Table 3**). Indeed, among the 39 STEC adhering to HCT-8, 15 presented an enhanced adherence (≥ 20 bacteria per cell), including six of seropathotype B (four O103:H2 and two O26:H11), and one of seropathotype A (the O157:H7 strain isolated from bovine feces). Nine strains exhibited an enhanced adherence (≥ 20 bacteria per cell) to HEp-2 cells. These nine adhering strains were all non-O157:H7 and included two O103:H2 strains of seropathotype B isolated from bovine feces.

ASSOCIATION BETWEEN ADHESION PROPERTIES AND GENES ENCODING FOR ADHESION FACTORS

Data regarding the presence of genes *eae*, *efa1*, *toxB*, *lpf*, *saa*, *astA*, *espP*, and *iha* are given in **Tables 2** and **3**. Among the 256 STEC strains, 38 (15%) were *eae*-positive (possessed the gene encoding for intimin), including all the STEC belonging to the seropathotypes A (13) and B (12). Twenty-two of these adhered either to HCT-8 and/or to HEp-2 cells, but most (13 of 22) adhered at a low level (1 to 5 bacteria/cell), and only 17 were clearly FAS-positive by the fluorescent actin staining assay. Overall, the presence of *eae* was associated with adhesion (Fisher, P < 0.00000001), and a strong association was observed between FAS-positive isolates and



FIGURE 1 | Determination of experimental conditions for bacterial adherence of *Escherichia coli* strains to human colonic carcinoma T84 cells. Cells were infected with bacteria grown for 3 h (exponential growth phase) or 18 h (stationary growth phase), in Luria Bertani Broth (LB) or in Cell Culture Medium (CCM), at 37°C before infection. The cells were then washed, treated with Triton X-100, and the recovered adherent bacteria were

belonging to seropathotype B (Fischer, P < 0.0000001), or isolation from a human with or without disease (Fischer, P = 0.00002). The gene *efa1*, associated to the *eae* gene and encoding for EHEC factor for adherence, was detected in 28 *eae*-positive strains (11% of the STEC).

Only 27 of 256 STEC (10%) were *toxB* positive: 17 adhered to HEp-2 and/or HCT-8 cells, and belonged to A or B seropathotype. An association was established between the *toxB* gene and adhesion (Fisher, P < 0.00000001).

Among the 256 strains, 201 (79%) were positive for the lpf gene encoding long polar fimbriae subunit A. Thirty three of the 47 adherent strains were positive for *lpf*₀₁₅₇, *lpf*₀₁₁₃, or *lpf*₀₉₁. operon. Regarding saa, encoding the STEC autoagglutinating adhesin, 82 strains (32%), belonging to the less virulent seropathotypes C, D, E, were positive, of which 11 were adherent. Regarding astA, encoding the East1 enteroaggregative heat-stable toxin 1, only 20 of the 256 STEC (8%) belonging to the seropathotypes D and E were positive, including 3 adherent isolates. Among the 256 strains, 122 (48%) were positive for the autotransporter EspP, shown to be involved in the formation of macroscopic rope-like fibers (Xicohtencatl-Cortes et al., 2010). Thirty-one adhered to HEp-2 and/or HCT-8 cells. Finally, 169 strains (66%) were positive for the gene encoding for Iha (a protein that confers adherence similar to Vibrio cholerae IrgA), of which 21 were adherent. No association was established between adhesion or seropathotype and the presence of the *lpf*, *saa*, *astA*, *efa1*, *espP*, or *iha* genes.

DISCUSSION

Shiga toxin-producing *E. coli* strains are an important cause of diarrheal and renal diseases in humans. They are associated with colonic pathology, and are considered as colonic pathogens, but the intestinal colonization process is still not well defined. In

diluted and plated for colony forming unit counting. Results are expressed as percentage of adherent bacteria, relative to adherent bacteria obtained after a 3 h growth in LB taken as 100%. EDL933: EHEC O157:H7; CH014: non-O157 STEC; C600: K-12 *E. coli*; E2348/69: EPEC. All assays were performed independently at least three times. Results are means \pm SEM of bacteria adhering to T84 cells.

the absence of a suitable animal model for STEC infection that reproduces the typical human disease from the initial step of colonization to HUS (Mallick et al., 2012), adherence to epithelial cell lines was expected to mimic the in vivo situation. In this study, we analyzed the adhesion properties of a collection of 256 STEC strains isolated from cattle, food, and humans, using the intestinal epithelial cell lines HCT-8 (from human ileocecal carcinoma), T84 (from human colonic carcinoma), and the HEp-2 cells from human larynx carcinoma. More than half (51%) of the strains of human origin (including patients and asymptomatic children) were adherent, while one third (34%) of the STEC isolated from food, and only 8% of the cattle strains were found to adhere. The strains belonged to the five seropathotypes A (most virulent) to E (not involved in human disease), described according to disease severity in humans, and to outbreaks or sporadic diseases (Karmali et al., 2003). Among the 256 STEC, the seropathotype B was significantly associated with the highest adherent strains on the HEp-2 or HCT-8 models. Our study revealed that, among the 47 adhering strains, 16 adhered only to HEp-2 or HCT-8, indicating that HEp-2 cells, widely used to explore adhesion of intestinal pathogenic E. coli might lack specific receptors. On the T84 model, EHEC O157:H7 strains (A seropathotype) adhered significantly more than those belonging to other serotypes, but the levels of adhesion observed were low. Interestingly, a high level of adhesion was not always associated with pathogenicity (assessed by the seropathotype): among the 18 STEC exhibiting the highest level of adhesion to HEp-2 and/or HCT-8 cells, eight belonged to the seropathotypes D and E. It would be interesting to test the highly adherent strains in a suitable in vivo model to determine their virulence, since they might represent emerging pathogens. The O104:H4 outbreak in Germany in 2011 highlighted the danger of such emerging pathogens, the O104:H4



FIGURE 2 | Adhesion of STEC strains to 184 cells line. (A) Quantitative adhesion of 17 STEC strains on the human colonic carcinoma cell line T84. Strains were grown to exponential growth phase at 37°C in CCM before infection. All assays were performed independently at least three times. Results are means \pm SD of bacteria adhering to T84 cells in CFU/well for the replicate experiments. A, seropathotype A; B, seropathotype B; C, seropathotype C; ND, seropathotype not

determined; Ref, reference strains. *The level of adhesion of EPEC E2348/69 strain was significantly different from all other strains tested (p < 0.01). (**B**) Adhesion pattern of EHEC O157:H7 (EDL933) strain (1, 3) and EPEC (E2348/69) strain (2, 4, and 5) stained with Giemsa (1, 2), or after scanning electron microscopy (SEM) analysis (3, 4, and 5). Scale bar = 10 μ m for Giemsa and SEM, Magnification ×2,300 (3), ×2,000 (4), ×3,500 (5) and ×10,000 (enlarged box).



strain possessed enteroaggregative adhesion factors that made it particularly virulent.

Studies evaluating the survival of an *E. coli* O157:H7 strain in simulated *in vitro* models of human digestive tract revealed bacterial growth and multiplication in the distal parts of the small intestine, and a progressive elimination of the pathogen in the colon (Etienne-Mesmin et al., 2011b; Thevenot et al., 2013). In human and bovine small intestinal xenografts, a large number of EHEC was also detected in the small intestinal lumen, but bacteria did not attach to the epithelium (Golan et al., 2011). The same study revealed poor bacterial growth associated with the formation of A/E lesions in human colon xenografts (Golan et al., 2011). In this study, we observed low levels of adhesion on colonic derived cells, in accordance with studies conducted using human intestinal IVOC, where a preferential tropism of EHEC for the follicle-associated epithelium (FAE) overlying ileal Peyer's patches (PPs), associated with a lack of colonic adhesion has been shown (Phillips et al., 2000; Fitzhenry et al., 2002; Chong et al., 2007). The PPs-rich distal ileum may represent the initial site of EHEC adhesion, from where bacteria would either spread to other regions of the gut, or translocate through M cells to underlying macrophages, which may be the first step in EHEC translocation and subsequent toxin transport across the intestinal barrier (Etienne-Mesmin et al., 2011a).

Several surface proteins and fimbriae structures have been described as putative adherence factors in STEC (Nicholls et al., 2000; Tarr et al., 2000; Fitzhenry et al., 2002, 2006; Toma et al., 2004; Cergole-Novella et al., 2007; Torres et al., 2007; Mahajan et al., 2009; Xicohtencatl-Cortes et al., 2009, 2010). Among them, intimin EaeA might play a role in tissue tropism, with intimin

pathotype	Serotype	Number of	Source	HCT-8 [§]	HEp-2 [§]	FAS assay				Presence	or absend	ce [†] of adh	esion			
		strains					eae‡	efal	toxB	Ipf ₀₁₅₇	Ipf0113	Ipf 091	saa	astA	espP	iha
A	0157:H7*	7	Human	0	0	1	~	+	+	+	I	I	I	I	+	+
		ო	Human	2	2	+ (1)	¥	+	+	+	I	I	Ι	Ι	+	+
		1	Animal	50	0	-/+	۲	+	+	+	I	I	I	I	+	+
		1	Food (meat)	2	2	+	۲	+	+	+	I	I	I	I	+	+
		1	Food (meat)	0	0	I	γ	+	+	+	I	I	I	I	+	+
	O103:H2	2	Animal	35	30	+	ω	+	+	I	I	I	I	I	+	+
		2	Human	30	т	+	ω	+	+	I	I	I	Ι	I	+	+
		0	Human	വ	2	+	ω	+	+	I	I	I	Ι	Ι	+	+
	O26:H11	2	Human	30	10	+	β	+	+	I	+	+	I	I	+	+
U	0157:H26	-	Human	4	4	+	β	I	I	I	I	I	I	I	I	ND
	0174:H2	-	Food (meat)	0	5	Ι	I	Ι	I	I	+	+	Ι	I	+	Ι
		-	Food (cheese)	0	0	Ι	I	I	I	I	+	+	+	I	+	I
		m	Animal	10	18	Ι	I	I	I	I	+	+	+	Ι	+	I
		2	Animal	Ð	0	Ι	I	I	I	Ι	+	+	+	Ι	+	Ι
		9	Animal	0	0	I	I	I	I	I	+	+	+	I	+	I
	05:H-	1	Human	0	4	I	β	+	I	I	+	+	I	I	+	ΔN
	06:H4	1	Human	10	ω	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	ΔN
	08:H2	1	Human	0	4	I	I	I	I	I	+	+	I	I	I	ΔN
	091:H21	1	Food (cheese)	30	10	I	I	I	I	I	+	+	+	I	I	I
		2	Food (meat)	0	0	Ι	Ι	I	I	Ι	+	+	+	I	I	I
		m	Animal	0	0	Ι	Ι	I	I	Ι	+	+	+	I	I	I
		2	Human	0	0	I	I	Ι	I	I	+	+	+	I	+	I
	-H:860	1	Animal	0	0	I	¥	I	I	I	+	+	I	I	+	ND
	OR:H16	1	Human	20	35	I	I	I	I	I	+	+	+	I	+	Ι

Sero-	Serotype	Number of	Source	HCT-8 [§]	HEp-2 [§]	FAS assay ^{ll}				Presence	or absen	ce [†] of adh	lesion			
pathotype		strains					eae‡	efal	toxB	Ipf ₀₁₅₇	Ipf ₀₁₁₃	Ipf ₀₉₁	saa	astA	espP	iha
D	O112ac:H19	1	Human	40	0	I	I	I	I	I	+	+	I	I	I	QN
		2	Animal	0	0	I	I	Ι	I	I	+	+	+ (1)	I	+ (1)	DN
	0113:H4	7	Animal	0	0	I	I	Ι	I	I	I	I	Ι	+ (1)	I	+
		1	Food (meat)	0	2	Ι	I	Ι	I	I	I	I	I	I	I	+
		1	Food (meat)	0	0	Ι	I	I	T	I	I	I	I	I	I	+
	0127:H+	-	Human	30	20	+	¥	Ι	I	I	I	I	+	I	+	+
	0171:H2	1	Animal	വ	0	Ι	I	Ι	I	Ι	+	+	+	Ι	+	+
		9	Animal	0	0	Ι	I	I	I	I	+	+	I	I	I	+
	075:H8	-	Food (meat)	30	10	Ι	I	I	I	I	+	+	I	I	I	DN
	077:H18	1	Animal	50	60	I	I	Ι	I	I	+	I	+	I	+	QN
	OR:H2	-	Animal	10	2	I	I	Ι	I	I	+	+	Ι	+	I	DN
	OR:K1:H-	. 	Human	30	50	I	I	I	I	I	+	+	I	I	I	ND
ш	"O"K84:H19	-	Animal	15	25	I					+	+	I	I	I	QN
	O102:H21	1	Animal	10	0	Ι	I	I	T	I	+	+	I	I	I	I
	O103:H14	1	Food (cheese)	30	С	Ι	I	Ι	I	I	+	+	I	I	I	I
	O150:H8	1	Food (meat)	0	5	Ι	Ι	Ι	I	Ι	+	+	I	I	Ι	DN
	O153:H8	1	Food (meat)	0	20	Ι	I	I	I	I	+	+	+	+	+	+
	015:H16	2	Animal	15	0	Ι	I	I	I	I	+	+	I	+	+ (1)	DN
	054:H2	-	Food (meat)	0	ო	I	I	I	I	I	+	+	I	I	Ι	ND
ND	OR:H+	1	Animal	10	20	I	ç	I	I	I	+	I	I	I	+	I
	-H:+0	-	Human	0	2	Ι	з	+	Ι	I	+	+	I	I	+	ND
EPEC	0127:H6	-	E2348/69	50	40	+	α	+	I	I	I	I	Ι	Ι	I	I
C600	K12	-	Laboratory	0	0	I	Ι	I	Ι	I	I	I	Ι	I	I	Ι
*EDL933 and HCT-8 and HEr negative by PC	86-24 reference st o-2; +/-, FAS-posit. CR and/or probe sta	trains are includeo ive on HCT-8 only: wing for the corre	, ^{\$} Mean number of number between pa sponding gene; num	^c adherent ba rrentheses in ber between	icteria /HCTE Idicates num parentheses	R and /HEp-2 cells ber of FAS-position indicates number	s. ^{II} FAS ac ve strains. 9r of positi	tivity on ++, four ve strain	HEp-2/H nd positiv. s. [‡] eae v.	CT-8 cells: e by PCR ar ariant identi	+, FAS-pos. 1d/or probe ified by PCF	itive on HC staining fo. ? (Pradel et.	'F8 and H r the corr al., 2000)	HEp-2; –, , esponding I. EPEC, ei	⁻ AS-negat gene; –, iteropatho	tive on found ogenic
Escherichia co.	vli; C600, E. coli K12	2 C600 negative cu	ontrol. ND, not deteri	mined.												

gamma appearing to restrict colonization of O157:H7 strains to human FAE (Fitzhenry et al., 2002). In our study, in addition to the *eae* gene, the *toxB* gene was clearly associated with adhesion to HEp-2, HCT-8, and T84 cell lines and isolation from humans. Taken together, adhesion levels were globally low among the 256 STEC tested and the *eae*⁺ *toxB*⁺ STEC of seropathotype B presented the highest adhesion level. The host and tissue specificity might also involve several other bacterial and host determinants important *in vivo* (Mundy et al., 2007; Ho et al., 2008; Xicohtencatl-Cortes et al., 2009). As previously reported for the *lpf* operons, their expression could be controlled by a tightly regulated process, depending on gastrointestinal conditions such as bile salts (Torres et al., 2007; Chassaing et al., 2013), rendering the role of Lpf difficult to establish during binding to epithelial cells.

Taken together, our data showed that it is very difficult to assess STEC virulence and ability to cause outbreaks in these models, and that *in vitro* adherence may not be an accurate reflection of molecular interactions that occur between STEC and human colonic epithelium *in vivo*. Developing more appropriate models to study the mechanisms of the first colonization steps would help in designing novel therapeutic approaches to EHEC infection.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: NP, LEM, VL. Performed the experiments: NP, LEM, JT, CC. Analyzed the data: NP, LEM, VL. Contributed reagents/materials/analysis tools: SBD, VL. Wrote the paper: NP, LEM, VL.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marlène Ajalbert and Muriel Millet for their help during adhesion experiments. We thank Christelle Blavignac from the Centre Imagerie Cellulaire Santé for Microscopy experiments. This study was supported by Université d'Auvergne, and grants from MESR, INSERM, INRA, and Région Auvergne.

REFERENCES

- Beutin, L. (2006). Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 53, 299–305. doi: 10.1111/j.1439-0450.2006.00968.x
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Kock, R., Fruth, A., Bauwens, A., et al. (2011). Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect. Dis.* 11, 671–676. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70165-7
- Cergole-Novella, M. C., Nishimura, L. S., Dos Santos, L. F., Irino, K., Vaz, T. M., Bergamini, A. M., et al. (2007). Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. *FEMS Microbiol. Lett.* 274, 329–334. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00856.x
- Chassaing, B., Etienne-Mesmin, L., Bonnet, R., and Darfeuille-Michaud, A. (2013). Bile salts induce long polar fimbriae expression favouring Crohn's diseaseassociated adherent-invasive *Escherichia coli* interaction with Peyer's patches. *Environ. Microbiol.* 15, 355–371. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02824.x
- Chong, Y., Fitzhenry, R., Heuschkel, R., Torrente, F., Frankel, G., and Phillips, A. D. (2007). Human intestinal tissue tropism in *Escherichia coli* O157: H7–initial colonization of terminal ileum and Peyer's patches and minimal colonic adhesion ex vivo. *Microbiology* 153, 794–802. doi: 10.1099/mic.0.2006/003178-0
- Clements, A., Young, J. C., Constantinou, N., and Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli. Gut Microbes* 3, 71–87. doi: 10.4161/gmic.19182
- Doughty, S., Sloan, J., Bennett-Wood, V., Robertson, M., Robins-Browne, R. M., and Hartland, E. L. (2002). Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative

strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli. Infect. Immun.* 70, 6761–6769. doi: 10.1128/IAI.70.12.6761-6769.2002

- Etienne-Mesmin, L., Chassaing, B., Sauvanet, P., Denizot, J., Blanquet-Diot, S., Darfeuille-Michaud, A., et al. (2011a). Interactions with M cells and macrophages as key steps in the pathogenesis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *PLoS ONE* 6:e23594. doi: 10.1371/journal.pone.0023594
- Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Privat, M., Denis, S., Cardot, J. M., Alric, M., et al. (2011b). Effect of a new probiotic Saccharomyces cerevisiae strain on survival of Escherichia coli O157:H7 in a dynamic gastrointestinal model. Appl. Environ. Microbiol. 77, 1127–1131. doi: 10.1128/AEM.02130-10
- Fitzhenry, R., Dahan, S., Torres, A. G., Chong, Y., Heuschkel, R., Murch, S. H., et al. (2006). Long polar fimbriae and tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7. *Microbes Infect*. 8, 1741–1749. doi: 10.1016/j.micinf.2006.02.012
- Fitzhenry, R. J., Pickard, D. J., Hartland, E. L., Reece, S., Dougan, G., Phillips, A. D., et al. (2002). Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Gut* 50, 180–185. doi: 10.1136/gut.50.2.180
- Frank, C., Werber, D., Cramer, J. P., Askar, M., Faber, M., An Der Heiden, M., et al. (2011). Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N. Engl. J. Med.* 365, 1771–1780. doi: 10.1056/NEJMoa1106483
- Girardeau, J. P., Dalmasso, A., Bertin, Y., Ducrot, C., Bord, S., Livrelli, V., et al. (2005). Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43, 6098–6107. doi: 10.1128/JCM.43.12.6098-6107.2005
- Golan, L., Gonen, E., Yagel, S., Rosenshine, I., and Shpigel, N. Y. (2011). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* induce attaching and effacing lesions and hemorrhagic colitis in human and bovine intestinal xenograft models. *Dis. Model. Mech.* 4, 86–94. doi: 10.1242/dmm.005777
- Hayward, R. D., Leong, J. M., Koronakis, V., and Campellone, K. G. (2006). Exploiting pathogenic *Escherichia coli* to model transmembrane receptor signalling. *Nat. Rev. Micro.* 4, 358–370. doi: 10.1038/nrmicro1391
- Ho, T. D., Davis, B. M., Ritchie, J. M., and Waldor, M. K. (2008). Type 2 secretion promotes enterohemorrhagic *Escherichia coli* adherence and intestinal colonization. *Infect. Immun.* 76, 1858–1865. doi: 10.1128/IAI.01688-07
- Hussein, H. S. (2007). Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J. Anim. Sci.* 85, E63–E72. doi: 10.2527/jas.2006-421
- Karmali, M. A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., et al. (2003). Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4930–4940. doi: 10.1128/JCM.41.11.4930-4940.2003
- Knutton, S., Baldwin, T., Williams, P. H., and Mcneish, A. S. (1989). Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57, 1290–1298.
- Li, Z., Elliott, E., Payne, J., Isaacs, J., Gunning, P., and O'loughlin E, V. (1999). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* can impair T84 cell structure and function without inducing attaching/effacing lesions. *Infect. Immun.* 67, 5938–5945.
- Mahajan, A., Currie, C. G., Mackie, S., Tree, J., Mcateer, S., Mckendrick, I., et al. (2009). An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157: H7 with bovine intestinal epithelium. *Cell. Microbiol.* 11, 121–137. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008. 01244.x
- Mallick, E. M., Mcbee, M. E., Vanguri, V. K., Melton-Celsa, A. R., Schlieper, K., Karalius, B. J., et al. (2012). A novel murine infection model for Shiga toxinproducing *Escherichia coli. J. Clin. Invest.* 122, 4012–4024. doi: 10.1172/JCI62746
- McKee, M. L., and O'Brien, A. D. (1995). Investigation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence characteristics and invasion potential reveals a new attachment pattern shared by intestinal *E. coli. Infect. Immun.* 63, 2070–2074.
- Mundy, R., Schuller, S., Girard, F., Fairbrother, J. M., Phillips, A. D., and Frankel, G. (2007). Functional studies of intimin in vivo and ex vivo: implications for host specificity and tissue tropism. *Microbiology* 153, 959–967. doi: 10.1099/mic.0.2006/003467-0
- Naylor, S. W., Low, J. C., Besser, T. E., Mahajan, A., Gunn, G. J., Pearce, M. C., et al. (2003). Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infect. Immun.* 71, 1505–1512. doi: 10.1128/IAI.71.3.1505-1512.2003

- Nicholls, L., Grant, T. H., and Robins-Browne, R. M. (2000). Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 35, 275–288. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01690.x
- Paton, J. C., and Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450–479.
- Phillips, A. D., Navabpour, S., Hicks, S., Dougan, G., Wallis, T., and Frankel, G. (2000). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut* 47, 377–381. doi: 10.1136/gut.47.3.377
- Pradel, N., Bertin, Y., Martin, C., and Livrelli, V. (2008). Molecular analysis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients and dairy samples in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2118–2128. doi: 10.1128/AEM.02688
- Pradel, N., Leroy-Setrin, S., Joly, B., and Livrelli, V. (2002). Genomic subtraction to identify and characterize sequences of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91:H21. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2316–2325. doi: 10.1128/AEM.68.5.2316-2325.2002
- Pradel, N., Livrelli, V., De Champs, C., Palcoux, J. B., Reynaud, A., Scheutz, F., et al. (2000). Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. J. Clin. Microbiol. 38, 1023–1031.
- Rangel, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P. M., and Swerdlow, D. L. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 603–609. doi: 10.3201/eid1104.040739
- Szalo, I. M., Goffaux, F., Pirson, V., Piérard, D., Ball, H., and Mainil, J. (2002). Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains. *Res. Microbiol.* 153, 653–658. doi: 10.1016/S0923-2508(02)01379-7
- Tarr, P. I., Bilge, S. S., Vary, J. C. Jr., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Ward, T. R., et al. (2000). Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect. Immun.* 68, 1400–1407. doi: 10.1128/IAI.68.3.1400-1407.2000
- Tarr, P. I., Neill, M. A., Clausen, C. R., Newland, J. W., Neill, R. J., and Moseley, S. L. (1989). Genotypic variation in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 isolated from patients in Washington, 1984–1987. *J. Infect. Dis.* 159, 344–347. doi: 10.1093/infdis/159.2.344
- Thevenot, J., Etienne-Mesmin, L., Denis, S., Chalancon, S., Alric, M., Livrelli, V., et al. (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 survival in an in vitro model of the human large intestine and interactions with probiotic yeasts and resident microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1058–1064. doi: 10.1128/AEM.03303-12
- Toma, C., Martinez Espinosa, E., Song, T., Miliwebsky, E., Chinen, I., Iyoda, S., et al. (2004). Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 42, 4937–4946. doi: 10.1128/JCM.42.11.4937-4946.2004

- Torres, A. G., Milflores-Flores, L., Garcia-Gallegos, J. G., Patel, S. D., Best, A., La Ragione, R. M., et al. (2007). Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae (LPF) of *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 177–185. doi: 10.1016/j.ijmm.2007.01.005
- Trachtman, H., Austin, C., Lewinski, M., and Stahl, R. A. (2012). Renal and neurological involvement in typical Shiga toxin-associated HUS. *Nat. Rev. Nephrol.* 8, 658–669. doi: 10.1038/nrneph.2012.196
- Winsor, D. K. Jr., Ashkenazi, S., Chiovetti, R., and Cleary, T. G. (1992). Adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains to a human colonic epithelial cell line (T84). *Infect. Immun.* 60, 1613–1617.
- Xicohtencatl-Cortes, J., Monteiro-Neto, V., Ledesma, M. A., Jordan, D. M., Francetic, O., Kaper, J. B., et al. (2007). Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Clin. Invest.* 117, 3519–3529. doi: 10.1172/JCI30727
- Xicohtencatl-Cortes, J., Monteiro-Neto, V., Saldana, Z., Ledesma, M. A., Puente, J. L., and Giron, J. A. (2009). The type 4 pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 are multipurpose structures with pathogenic attributes. *J. Bacteriol.* 191, 411–421. doi: 10.1128/JB.01306-08
- Xicohtencatl-Cortes, J., Saldana, Z., Deng, W., Castaneda, E., Freer, E., Tarr, P. I., et al. (2010). Bacterial macroscopic rope-like fibers with cytopathic and adhesive properties. J. Biol. Chem. 285, 32336–32342. doi: 10.1074/jbc.M110.162248
- Yamamoto, T., Wakisaka, N., Sato, F., and Kato, A. (1997). Comparison of the nucleotide sequence of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea-associated *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 147, 89–95. doi: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb10225.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 12 December 2014; accepted: 10 Febuary 2015; published online: 27 February 2015.

Citation: Pradel N, Etienne-Mesmin L, Thévenot J, Cordonnier C, Blanquet-Diot S and Livrelli V (2015) In vitro adhesion properties of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from cattle, food, and humans. Front. Microbiol. **6**:156. doi: 10.3389/fmicb.2015.00156

This article was submitted to Infectious Diseases, a section of the journal Frontiers in Microbiology.

Copyright © 2015 Pradel, Etienne-Mesmin, Thévenot, Cordonnier, Blanquet-Diot and Livrelli. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CURRICULUM VITAE

(Mise à jour du 01.03.2017)

CHARLOTTE CORDONNIER - Ph.D. -

French, Age 28 (02/02/1989) cordonnier.charlotte@wanadoo.fr

PROFESSIONAL ADDRESS Department of Microbiology and Immunology University at Buffalo School of Medicine 347 Biomedical Research Building 3435 Main Street Buffalo, NY 14214, USA

RESEARCH EXPERIEN	NCE AND	EDUCATION
— 2017 TO PRESENT —	Postdoct	coral position in Parasitology, <i>Toxoplasma gondii</i> biology
Department of Microbiology and Immunology University at Buffalo Buffalo, New-York, USA	Project: Advisor:	Mechanisms involved in host-parasite interactions and in parasite virulence Prof Ira Blader, <i>iblader@buffalo.edu</i>
<u> </u>	Tempora and Anir	ary assistant lecturer position in Microbiology, Parasitology nal physiology
M2iSH INSERM U1071 28, place Henri Dunant	Project:	Mechanisms involved in enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> interaction with interaction
Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, FRANCE	Advisors:	Prof Valérie Livrelli, <i>valerie.livrelli@udamail.fr</i> Dr Jean-François Jarrige, <i>j-francois.jarrige@udamail.fr</i>
<u> </u>	Ph.D. in	Microbiology and Biotechnology
M2iSH INSERM U1071 and EA CIDAM 28, place Henri Dunant Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, FRANCE	Project: Advisors:	Survival and pathogenicity of enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i> in human digestive environment: interaction with microbiota and intestinal epithelium. Influence of yeast probiotic administration Prof Valérie Livrelli, <i>valerie.livrelli@udamail.fr</i> Dr Stéphanie Blanquet-Diot, <i>stephanie.blanquet@udamail.fr</i>
2012	M.Sc., G	enetic and Physiology
INRA Clermont-Ferrand-Theix UR454 Microbiologie St-Genes-Champanelle, FRANCE	Project: (6 months) Advisor:	Identification of Shigatoxin production-inhibitory molecules secreted by intestinal bacteria: <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> Dr Grégory Jubelin, <i>gregory.jubelin@clermont.inra.fr</i>
2011	• M.Sc., G	enetic and Physiology
Center for Genetics and Genomics School of Biology University of Nottingham	Project: (2 months)	Functional analysis of Cyclin 4 in Plasmodium berghei
ENGLAND	Advisor:	Prof Rita Tewari, rita.tewari@nottingham.ac.uk
TECHNICAL SKILLS		

Microbiology: identification, culture of microorganisms (aerobic and anaerobic bacteria, yeasts), manipulation of pathogenic bacteria in secure containment laboratory, bacterial transformation and conjugaison, flagella and pili extraction

Molecular Biology: RNA and DNA analysis : DNA purification, PCR amplification, isogenic mutant construction (site-directed mutagenesis and mutation breeding), RNA purification and mRNA quantification, qRT-PCR; Arbitrariry Primed PCR, Protein analysis: Western blot, ELISA

Cellular Biology: cell culture of intestinal epithelial cells (Vero cells, Caco-2, T84, M cells), lymphocytes B (RajiB) and macrophages (THP-1), bacterial adhesion and invasion assays, macrophage survival assay, confocal microscopy, transmission electron microscopy

Biotechnology: *in vitro* digestion in artificial model of the upper gastrointestinal tract (TIM1, TNO gastro Intestinal tract Model) and *in vitro* fermentation in the presence of human microbiota (Artificial COLon model), Ussing chambers

Animal experimentation: oral administration, organ collection, bacteria colonization, microorganism interaction with intestinal epihelium: *in vivo* ileal loop assay, *in vitro* tests on murine Peyer's patches

1. <u>Cordonnier C.</u>, Etienne-Mesmin L., Thévenot J., Rougeron A., Renier S., Chassaing B., Darfeuille-Michaud A., Barnich N., Blanquet-Diot S., Livrelli. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis: role of Long polar fimbriae in Peyer's patches interactions. 2017, *Scientific report* – (IF: 5.228)

2. Roussel C.*, <u>Cordonnier C.*</u>, Livrelli V., Van de Wiele T., Blanquet-Diot S. Intestinal pathogenic *Escherichia coli*: survival and modulation of virulence through the human gastrointestinal tract. 2016, Chapter in the book *"Escherichia coli*", published by InTech – Open Access Publisher

3. <u>Cordonnier C.</u>, Thévenot J., Etienne-Mesmin L., Alric M., Livrelli V., Blanquet-Diot S. Probiotic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: an effective strategy against a deadly enemy? 2016, *Critical Reviews in Microbiology* – (IF: 6.020)

4. Roussel C.*, <u>Cordonnier C.*</u>, Wessam G., Le Goff O., Thévenot J., Chalancon S., Alric M., Thevenot-Sergentet D., Leriche F., Van de Wiele T., Livrelli V., Blanquet-Diot S. Use of a gastrointestinal model to promote understanding of EHEC pathogenesis in high-risk infants. 2016, *Pediatric research* – (IF: 2.761)

5. <u>Cordonnier C.*</u>, Le Bihan G.*, Emond-Rheault JG., Garrivier A., Harel J., Jubelin G. Vitamin B12 Uptake by the Gut Commensal Bacteria *Bacteroides thetaiotaomicron* Limits the Production of Shiga Toxin by Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 2016, *Toxins* – (IF: 3.571)

6. <u>Cordonnier C.*</u>, Thévenot J.*, Etienne-Mesmin L., Denis S., Alric M., Livrelli V., Blanquet-Diot S. Use of dynamic *in vitro* models of the human gastrointestinal tract to assess the survival of a new probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain and its interactions with gut microbiota. 2015, *Microorganisms* – (IF not yet available)

7. Thévenot J.*, <u>Cordonnier C.*</u>, Rougeron A., Le Goff O., Nguyen H.T.T., Denis S., Alric M., Livrelli V., Blanquet-Diot S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection has donor-dependent effect on human gut microbiota and may be antagonized by probiotic yeast during interaction with Peyer's patches. 2015, *Applied Microbiology and Biotechnology* – (IF: 3.376)

8. Pradel N., Etienne-Mesmin L., Thévenot J., <u>Cordonnier C.</u>, Blanquet-Diot S., Livrelli V. *In vitro* adhesion properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and humans. 2015 - *Frontiers in Microbiology* – (IF: 3.989)

TALKS / POSTERS

* TALKS

INTERNATIONAL

United European Gastroenterology Week, Vienna, Autriche – October 2016

- Cordonnier C., Ramboz J., Thévenot J., Etienne-Mesmin L., Rougeron A., Rénier S., Barnich N., Blanquet-Diot S., Livrelli V. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* tropism to Peyer's patches: role of Long Polar Fimbriae and inhibition by a probiotic yeast.
- 9th Triennial International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-producing Escherichia coli, Boston, US September 2015
- Cordonnier C., Etienne-Mesmin L., Thévenot J., Rénier S., Rougeron A., Barnich N., Blanquet-Diot S., Livrelli V. Enterohemorrhagic Escherichia coli tropism to Peyer's patches: implication of Long Polar Fimbriae.

Digestive Disease Week, Washington, US – May 2015

□ Cordonnier C., Thévenot J., Etienne-Mesmin L., Rougeron A., Rénier S., Blanquet-Diot S., Barnich N., Livrelli V. Role of Long Polar Fimbriae in the interactions of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* with Peyer's Patches and inhibition by a probiotic yeast.

NATIONAL

«13ème rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois », Clermont-Ferrand, France – April 2016

Cordonnier C., Thévenot J., Etienne-Mesmin L., Rougeron A., Rénier S., Blanquet-Diot S., Barnich N., Livrelli V. Interaction des Escherichia coli entérohémorragiques avec l'épithélium intestinal et stratégie probiotique.

Journées des Ecoles Doctorales, Clermont-Ferrand, France – May 2015

Cordonnier C., Etienne-Mesmin L., Thévenot J., Rénier S., Rougeron A., Barnich N., Blanquet-Diot S., Livrelli V. Interactions des Escherichia coli entérohemorragiques avec la muqueuse intestinale et influence d'une levure probiotique.

✤ POSTERS (1/2)

5th Beneficial Microbes congerences: pre- and probiotics for lifelong human and animal health, Amsterdam, The Netherlands – October 2016
 Roussel C., Cordonnier C., Wessam G., Le Goff O., Thévenot J., Chalancon S., Alric M., Thevenot-Sergentet D., Leriche F., Livrelli V., Van de Wiele T., Blanquet-Diot S. Use of the gastrointestinal TIM system to promote understanding of enteric pathogen behavior in the infant GIT: application to the evaluation of probiotics as an alternative strategy for infection control.

✤ POSTERS (2/2)

Gut microbiology - 10th Joint Symposium INRA-ROWETT, Clermont-Ferrand, France – June 2016

- Cordonnier C., Thévenot J., Etienne-Mesmin L., Blanquet-Diot S., Livrelli V. Probiotic strategy with a Saccharomyces cerevisiae strain in the fight against enterohemorrhagic Escherichia coli.
- Cordonnier C., Etienne-Mesmin L., Thévenot J., Rénier S., Rougeron A., Barnich N., Blanquet-Diot S., Livrelli V. Long Polar Fimbriae mediate EHEC tropism to Peyer's patches.
- Roussel C., <u>Cordonnier C.</u>, Wessam G., Le Goff O., Thévenot J., Chalancon S., Alric M., Thevenot-Sergentet D., Leriche F., Livrelli V., Van de Wiele T., Blanquet-Diot S. Increased EHEC survival and virulence gene expression indicate an enhanced pathogenesis upon simulated infant gastrointestinal conditions.

Microbiome R&D and Business Collaboration forum: Europe, London, UK – April 2016

- Roussel C., <u>Cordonnier C.</u>, Wessam G., Le Goff O., Thévenot J., Chalancon S., Alric M., Thevenot-Sergentet D., Leriche F., Livrelli V., Van de Wiele T., Blanquet-Diot S. Use of the dynamic gastrointestinal TIM system to promote understanding of food-borne pathogen survival and virulence in the infant at-risk population.
- 9th Triennial International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-producing Escherichia coli, Boston, US September 2015
- Cordonnier C., Thévenot J., Denis S., Nguyen H.T.T., Alric M., Livrelli V., Blanquet-Diot S. Use of a dynamic in vitro model of the human colon to assess the survival and virulence of EHEC O157:H7 in the large intestine and its interactions with gut microbiota.
- Cordonnier C., Thévenot J., Miszczycha S., Denis S., Chalancon S., Alric M., Thevenot-Sergentet D., Livrelli V., Blanquet-Diot S. Use of the dynamic multi-compartmental TIM system to assess the behavior of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the upper human digestive tract: impact of serotypes and food vehicle.
- Cordonnier C., Thévenot J., Etienne-Mesmin L., Blanquet-Diot S., Livrelli V. Antagonistic properties of the probiotic yeast Saccharomyces cerevisiae on enterohemorrhagic Escherichia coli.
- Pradel N., <u>Cordonnier C.</u>, Etienne-Mesmin L., Thévenot J., Ajalbert M., Blanquet-Diot S., Livrelli V. *In vitro* adhesion properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are not related to pathogenicity.
- Roussel C., <u>Cordonnier C.</u>, Wessam G., Le Goff O., Thévenot J., Chalancon S., Alric M., Thevenot-Sergentet D., Leriche F., Livrelli V., Van de Wiele T., Blanquet-Diot S. Comparative study of EHEC survival and virulence under adult and infant simulated digestive conditions.

International Congress of Translational Research in Human Nutrition, Clermont-Ferrand, France – June 2015

- Cordonnier C., Thévenot J., Etienne-Mesmin L., Denis S., Alric M., Livrelli V., Blanquet-Diot S. EHEC survival and virulence in human simulated digestive conditions: interaction with gut microbiota and antagonistic effect of a probiotic yeast.
- Cordonnier C., Etienne-Mesmin L., Thévenot J., Nguyen H.T.T., Barnich N., Blanquet-Diot S., Livrelli V. EHEC interactions with Peyer's patches and antagonistic effect of the probiotic yeast Saccharomyces cerevisiae.

International Pharmabiotics Conference, Paris, France – October 2014

Cordonnier C., Thévenot J., Étienne-Mesmin L., Rougeron A., Denis S., Alric M., Livrelli V., Blanquet-Diot S. Probiotic strategy in the fight against enterohemorrhagic Escherichia coli.

United European Gastroenterology Week, Vienne, Autriche – October 2014

Cordonnier C., Etienne-Mesmin L., Rougeron A., Thévenot J., Blanquet-Diot S., Darfeuille-Michaud A., Livrelli V. Enterohemorragic Escherichia coli target Peyer's patches via Long Polar Fimbriae.

AWARDS

- > Oral Free Paper Prize (Free Paper Session: GI infections from mechanism to treatment UEGW week Vienna 2016)
- Travel grant for 2016 UEGW meeting (Basis Science Travel Grant awarded UEGW week Vienna 2016)
- Travel grant for 2012 VTEC meeting (Conseil Regional Auvergne)

TEACHING AND SUPERVISORY EXPERIENCE

Institute of Technology, University of Auvergne, Clermont-Ferrand, France

- Temporary assistant lecturer position in Microbiology, Parasitology and Animal physiology, September 2015 – August 2016
- Teaching assistant, Human physiology, October 2012 September 2015

University of Auvergne, Clermont-Ferrand, France

- Supervising of 1 student, M. Sc. Genetic and Physiology, (6 months) 2016
- ➤ Supervising of 1 student, M. Sc. Genome, Ecology and Biotechnology, (2 months) 2014
- ➤ Supervising of 2 students, two-year university degree in technology, (2 months) 2014, 2015

Research interests

- Host-pathogen interactions
- Microbiology
- ➢ Cellular biology

Résumé

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont des pathogènes majeurs pour l'homme responsables de toxiinfections alimentaires pouvant évoluer vers des complications potentiellement mortelles. La pathogénicité de ces souches est essentiellement due à la production de Shiga-toxines (Stx), même si d'autres facteurs semblent jouer un rôle important dans la virulence, comme des facteurs d'adhésion. La survie et la régulation des facteurs de virulence des EHEC dans l'environnement digestif humain sont des facteurs clés dans la pathogénicité bactérienne, mais restent à ce jour mal décrits, essentiellement en raison d'un manque de modèles d'étude adaptés. De plus, l'absence de traitement spécifique a conduit à s'intéresser à des moyens préventifs et/ou curatifs alternatifs, comme l'utilisation de probiotiques. L'objectif de ce travail de thèse est (i) **de mieux comprendre le comportement** de la souche de référence EHEC O157:H7 EDL933 dans l'environnement digestif humain simulé, et en particulier ses interactions avec le microbiote résident et l'épithélium intestinal, et (ii) **d'évaluer l'effet antagoniste d'une souche de levure probiotique** vis-à-vis de la survie, la virulence et l'interaction du pathogène avec l'épithélium intestinal, à l'aide d'approches *in vitro* et *in vivo* complémentaires.

En modèles digestifs *in vitro*, la souche EHEC survit dans l'estomac, voire se multiplie dans les parties distales de l'intestin grêle, alors qu'elle ne se maintient pas dans l'environnement colique. Les gènes de virulence codant les Stx et des adhésines majeurs (intimine et « Long Polar Fimbriae » ou Lpf) sont surexprimés dès les parties hautes du tractus digestifs, et ce, même en absence de cellules épithéliales. Les conditions rencontrées dans le tractus digestif supérieur de l'enfant, comparativement à celui de l'adulte, conduisent à une survie et un niveau d'expression des gènes codant les Stx et les Lpf plus élevés chez l'enfant, ce qui peut contribuer à expliquer la grande sensibilité de cette population aux infections à EHEC. Enfin, les Lpf semblent jouent un rôle clé dans le ciblage spécifique des cellules M et le tropisme des EHEC pour les plaques de Peyer, et ce, à la fois *in vitro* (cellules M en culture) et *in vivo* (anses iléales murines). Même si elle ne modifie pas la survie du pathogène dans l'environnement colique, la levure probiotique *S. cerevisiae* CNCM I-3856 a montré des propriétés antagonistes intéressantes vis-à-vis d'EHEC O157:H7 en (i) modulant favorablement l'activité fermentaire du microbiote intestinal, (ii) diminuant significativement l'expression des gènes codant les Stx et (iii) inhibant la translocation bactérienne au travers des plaques de Peyer et les lésions hémorragiques associées. Par ailleurs, l'effet du pathogène et des probiotiques sur le microbiote colique est individu dépendant, confortant l'hypothèse que des facteurs associés à l'hôte, comme le microbiote, pourraient conditionner l'évolution clinique des infections à EHEC et l'efficacité d'une stratégie probiotique.

Ce travail de thèse contribue à une meilleure compréhension du comportement des EHEC dans l'environnement digestif humain et confirme l'intérêt d'une stratégie probiotique dans la lutte contre le pathogène. Une étude plus approfondie du transcriptome du pathogène dans l'environnement digestif et une analyse par des méthodes haut débit du microbiote intestinal permettraient de continuer à mieux décrire la physiopathologie des infections à EHEC et comprendre les mécanismes associés à l'effet antagoniste des probiotiques.

Mots clefs : Escherichia coli enterohémorragique, Système de digestion *in vitro*, Microbiote, Probiotique, Anses iléales murines, Long Polar Fimbriae

ABSTRACT

The enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are major zoonotic pathogens responsible for food-borne infection which leads to life-threatening complications in humans. The main virulence determinant of EHEC is the production of Shiga toxins (Stx), even if other factors seem to play an important role in virulence, such as adhesion factors. Survival and virulence of EHEC strains in the human digestive environment are a key factor in bacterial pathogenesis but remains unclear owing to lack of relevant model. Moreover, no specific treatment has led to interest in preventative and / or curative alternatives, such as using probiotics. The objective of this study is to **better understand the behavior** of the reference strain EHEC O157:H7 EDL933 in the entire digestive tract, and in particular its interaction with the resident microbiota and the intestinal epithelium, and to **evaluate the antagonistic effect of the probiotic yeast**, *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856, using *in vitro* and *in vivo* complementary approaches.

In vitro, bacterial mortality was noticed in the stomach, whereas bacterial growth resumption was observed in the distal parts of the small intestine and the pathogen was not able to maintain in the human colonic conditions. Virulence genes encoding Stx and adhesins (intimin and "Long polar fimbriae") are upregulated in the upper parts of the digestive tract. A tentime higher amount of cells was found in the ileal effluents of infant compared to adult. *stx* genes were over-expressed (up to 25-fold) in infant conditions compared to the adult ones. This results show that differences in digestive physicochemical parameters of the upper gastrointestinal tract may partially explain why infants are more susceptible to EHEC infection than adults. And finally, Lpf seem to play a key role in the interactions of EHEC with murine Peyer's patches and are needed for an active translocation of the pathogen across M cells, and both *in vitro* (M cells culture) and *in vivo* (murine ileal loops).

S. cerevisiae had not effect on EHEC survival in the colonic environment but (i) favorably influenced gut microbiota activity through beneficial modulation of short chain fatty acid production, (ii) leading to significantly decrease *stx* expression and (iii) significantly reduced EHEC translocation through M cells and inhibited *in vivo* interactions of the pathogen with Peyer's patches and the associated hemorrhagic lesions. Probiotic had donor-dependent effect on the gut microbiota strengthen the hypothesis that host-associated factors such as microbiota could influence the clinical evolution of EHEC infection and the effectiveness of a probiotic strategy.

This work contributes to a better understanding of the behavior of EHEC in the human digestive environment and confirms the interest of probiotic strategy in controlling EHEC infections. Further transcriptome studies are warranted for the pathogen in the human digestive environment, with or without probiotics for the better understanding of the pathophysiology of EHEC and so on the mechanisms involved in the antagonistic effect of probiotics.

Keywords: Enterohemorrhagic Escherichia coli, Digestive in vitro model, Gut microbiota, Probiotic, Mice ileal loops, Long Polar Fimbriae