



HAL
open science

Les exosomes, médiateurs fondamentaux de la communication intercellulaire au cours de l'infection par les bactéries AIEC impliquées dans la maladie de Crohn

Anaïs Larabi

► To cite this version:

Anaïs Larabi. Les exosomes, médiateurs fondamentaux de la communication intercellulaire au cours de l'infection par les bactéries AIEC impliquées dans la maladie de Crohn. Médecine humaine et pathologie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2019. Français. NNT : 2019CLFAS018 . tel-02525782

HAL Id: tel-02525782

<https://theses.hal.science/tel-02525782>

Submitted on 31 Mar 2020

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.

*ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ,
AGRONOMIE & ENVIRONNEMENT*

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne
pour l'obtention du grade de **Docteur d'Université**
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : **Microbiologie cellulaire**

Soutenue le 29 novembre 2019

LARABI Anaïs

**Les exosomes, médiateurs fondamentaux de la communication
intercellulaire au cours de l'infection par les bactéries AIEC
impliquées dans la maladie de Crohn**

Rapporteurs

Mme. ROME Sophie, Directrice de Recherche INRA, INSERM U1060, INRA U1397, Université Lyon1

M. BARREAU Frédéric, Chargé de Recherche INSERM, INSERM IRSD U1220, Toulouse

M. FOLIGNE Benoît, Professeur des Universités, LIRIC - UMR 995 Inserm Université de Lille

Examineurs

Mme. ALRIC Monique, Professeure des Universités, UMR454 MEDIS, INRA, Université Clermont Auvergne

M. LAPAQUETTE Pierre, Maître de Conférences des Universités, UMR A PAM, Université de Bourgogne

Directeurs de thèse

Mme. NGUYEN Hang, Chargée de Recherche, INSERM UMR1071, Université Clermont Auvergne

M. DELMAS Julien, Maître de Conférences des Universités et Praticien Hospitalier, INSERM UMR1071, Université Clermont Auvergne

Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte (M2iSH)
Université Clermont Auvergne, UMR1071 INSERM, INRA USC-2018
28 Place Henri Dunant – 63001 Clermont-Ferrand Cedex

Remerciements

Je tiens à remercier très sincèrement **Madame Sophie Rome**, **Monsieur Benoît Foligné** et **Monsieur Frédérick Barreau** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je tiens également à remercier **Monsieur Pierre Lapaquette** d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse. Enfin, merci à **Madame Monique Alric** d'avoir accepté d'être examinatrice mais également Présidente du jury de cette thèse. Merci à l'ensemble des membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce travail.

Je souhaite remercier **Julien Delmas** et **Hang Nguyen** pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse avec eux. **Julien**, merci de m'avoir permis de réaliser ma thèse sous ta direction, pour les conseils que tu as pu me donner sur les manips, la relecture des manuscrits et pour ta bonne humeur ! **Hang**, merci pour tout ce que tu as fait pendant ces trois ans et demi. Dès le début du stage de master, j'ai su que je voulais réaliser ma thèse avec toi, m'enrichir de ton expérience scientifique et de tes qualités humaines, et je suis vraiment heureuse que cela ait été possible. Merci pour ta disponibilité, pour tous ces moments passés à parler de sciences, pour toutes les fois où tu m'as réexpliqué ton point de vue sur une manip sans jamais t'énerver face à mes « oui mais ... » et pour ta franchise qui parfois secoue un peu mais qui m'a permis de m'améliorer. Merci aussi pour tes conseils aussi bien sur des sujets professionnels que plus personnels et ces heures à papoter de choses et d'autres dans ton bureau ou en congrès. Je suis heureuse d'avoir pu rencontrer quelqu'un comme toi, et j'espère que tu as apprécié ces trois ans autant que moi.

Nicolas, merci aussi pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans ton laboratoire et de me rendre à de nombreux congrès nationaux et internationaux qui m'ont beaucoup apporté tant au niveau professionnel que personnel. Je me souviendrai tout particulièrement de ce premier vol en avion pour se rendre à Vienne où tu me disais « mais n'aie pas peur, regarde par le hublot, on est déjà au moins à 400 m d'altitude ! ». Finalement, 3 ans plus tard, c'est avec le sourire que j'ai pu monter à tes côtés dans l'avion pour rejoindre Montréal. Merci pour tout.

Guillaume, merci pour ton humour et ta bonne humeur, ce fut un plaisir de travailler avec toi ! **Mathilde**, je te remercie pour ces discussions à propos des post-docs et de la recherche dans le monde de l'industrie, je pense que cela m'aidera à choisir où partir pour de nouvelles aventures. **Elisabeth**, j'ai apprécié discuter avec toi en salle café. Je te remercie pour la relecture de la partie discussion de ce manuscrit et pour tes conseils avisés en immuno. **Valérie**, c'est grâce à toi que j'ai pu encadrer mon premier (et unique) stagiaire, je te remercie pour cette opportunité. **Delphine** et **Jérémy**, merci pour les bons moments passés durant ces 3 ans, notamment lors des congrès.

Merci aussi à toute la communauté des Techniciens, Ingénieurs et Assistants Ingénieurs qui ont au quotidien participé au bon fonctionnement du labo. Merci à **Adeline**, j'ai adoré travailler avec toi et surtout, depuis que je t'ai rencontrée, je me dis que je ne suis pas si folle à parler toute seule ! **Caroline**, je ne serai plus là pour fermer le labo les jours où tu ne peux pas... Merci pour ton aide précieuse pour les qPCR. **Emilie**, merci pour ces moments passés à discuter, le matin au labo ou lors du congrès de l'UEGW à Vienne. Tu as toujours su me faire comprendre que la vie à l'extérieur du labo est importante et qu'il faut la privilégier. Merci de m'avoir initiée au vélo, et même si nous n'avons pas eu l'occasion d'y retourner ensemble (pour l'instant !), j'ai passé un super moment ce jour-là ! **Stéphanie**, j'ai adoré être ta voisine de paillasse et pouvoir te piquer tes marqueurs (sans casser la mine en appuyant trop fort !), j'espère que je n'ai pas trop poussé tes boîtes bien organisées avec mon chantier ! Et désolée pour les nombreux cônes qui ont loupé ma poubelle et fini sur ta paillasse... **Alexandra**, merci pour ces

discussions que l'on a pu avoir et pour ton aide précieuse pour les génotypages. Tu m'as fait gagner un temps fou ! **Sandra**, merci pour ta bonne humeur chaque jour à la pause café.

Un énorme merci à mes amis « Gilets Jaunes ». **Cécily** et **Anne-So**, merci les filles pour tous ces moments passés ensemble, ces midis au soleil sur la terrasse chez Mika à discuter de tout et de rien et les soirées resto ;-). **Anne-So**, ce fut un plaisir de travailler avec toi, de t'écouter chanter et de me laisser contaminer par ta bonne humeur. **Cécily**, désolée de t'avoir shootée au Toplexil en Croatie ! Je garde un merveilleux souvenir du temps passé ensemble en congrès ou au labo, ainsi que de ton mariage avec Mika (toi qui disais « Mika ? Moi ? Oh non, jamais ! »). **Mika** et **Antoine**, merci les gars pour votre bonne humeur et vos idées toujours plus farfelues (et si on dessine au feutre sur un sopalin et qu'on met de l'éthanol, ça peut faire joli, non ?). **Patrick**, **Jaja**, que dire, vous êtes au top ! J'ai passé d'excellents moments avec vous au labo ou en dehors. Merci pour les cafés du matin et l'apéro du reste de la journée ! Faites attention aux brouettes et aux ronds-points, les filles ;-).

Merci à mes amis « du bureau ». **Gwen**, cela fait 7 ans que l'on se connaît, j'ai passé d'excellents moments avec toi, que ce soit sur les bancs de la fac ou au labo. Nous avons souvent parlé famille ensemble, et je suis heureuse d'avoir vu la tienne s'agrandir. **Laurène**, tu t'es lancée dans cette grande aventure qu'est la thèse, pour notre plus grand bonheur ! Merci de nous faire tant rire avec tes boulettes, en contrepartie tu as bien pu te moquer de mon côté Pierre Richard ! Je te souhaite de passer d'aussi belles années que les miennes dans ce labo, et je suis certaine que tu réussiras ta thèse avec brio. **Clara**, ma clarinette, merci pour tous ces moments à discuter, ta zen-attitude et ta bonne humeur ! Je te souhaite le meilleur pour la fin de ta thèse, tu verras, c'est pas toujours simple, mais c'est quand même « gavé bien » ! **Romain**, il faut le dire, t'es vraiment top comme voisin ! Merci pour toutes les discussions qu'on a pu avoir lors de nos trajets en voiture et pour l'initiation à l'escalade. C'est promis, je reviendrai, mais avant je trouverai des chaussons, parce qu'une paire pour deux, ce n'est quand même pas très pratique... Merci pour ta bonne humeur et ton humour, j'ai vraiment passé de super moments avec toi. **Virginie**, nous ne partageons pas le même bureau mais tu es ma colocataire d'animalerie, et vu le temps qu'on peut y passer c'est presque pareil ! Merci d'avoir su me motiver à aller faire le change/nettoyer la pièce/faire les sevrages. Malgré le côté barbant de la chose, on a passé de bons moments. PS : même si je n'en ai vu que la moitié, tu as une bien jolie paire de ... euh ... culotte :-P. **Maëva**, merci pour ta franchise et ton franc-parler ! Je suis heureuse que l'on ait appris à se connaître et ce fut un plaisir de passer du temps avec toi. **Melissa**, ta thèse ne fait que commencer, mais je ne doute pas de ta réussite ! Bon courage dans cette aventure ! **Claire**, merci pour les après-midis à papoter au bureau, de tout de rien, de manip souris, d'oméga-3, de biopsies du muscle etc. et pour tes conseils sur les formations aux premiers secours. J'espère un jour te croiser sur un événement encadré par l'umps63. **Elodie**, malgré les difficultés je garde d'excellents souvenirs des moments passés ensemble. Bon courage pour la fin de ta thèse. **Hanh**, you're the last one arrived in the « Team Hang », I hope you will have a great time in France and in the lab. I wish you good luck for your post-doc. **Karine**, nous n'avons pas tellement eu l'occasion de beaucoup discuter, je te souhaite bon courage pour la fin de ton année recherche et ton parcours de médecin. Enfin, merci aux copains stagiaires, partis pour de nouvelles aventures, toujours avec nous ou bientôt de retour, **Thomas**, **Iris**, **Emmie**, **Michel**, **Gwënaelle** et **Célia**. J'ai passé de bons moments en votre compagnie.

Je souhaite également remercier quelques « anciens » du bureau. **Jessica**, merci pour ton encadrement lors de mon master et de m'avoir permis de prendre la suite de ton projet. **Amélie**, merci pour tes précieux conseils à propos de la thèse et de la recherche de post-doc, je te souhaite beaucoup de bonheur aux USA ! **Alexis**, **Gwladys**, **Florie**, merci pour ces moments passés à papoter au bureau, en congrès ou autour d'un café.

Je remercie également **Anthony**. Merci pour ta sympathie et non, même par 40°C, il ne fait pas chaud dans mes Dr Martens ! **Sandrine**, j'ai beaucoup apprécié nos discussions sur ce métier un peu particulier, je te souhaite beaucoup de réussite pour la suite. Je n'oublie pas non plus **Pr Bonnet, Tiphanie, Aurélien** et **Pierre** du R3. Merci également à **Marie-Pierre**, toujours étonnée de me voir débarquer au labo avant 6h, merci de nous avoir permis de travailler dans de très bonnes conditions. Merci à vous.

Merci également à **Aurore Dubuffet** et **Olivier Bardot** d'avoir suivi ce travail lors de mes comités de thèse. **Aurore**, merci de m'avoir permis de découvrir la recherche à tes cotés lors de mon stage en L3.

Pour finir, merci aux filles du CICS, **Christelle Blavignac, Lorraine Gameiro** et **Claire Szczepaniak** ainsi qu'à **Caroline Vachias** de la plateforme CLIC pour leur assistance technique pour la microscopie.

Un énorme merci à mes amis qui m'ont soutenue pendant toutes ces années d'études. **Morgane**, ça fait maintenant 15 ans que tu es à mes cotés, je ne te remercierai jamais assez pour le jour où tu m'as dit « Viens passer une semaine avec moi à Clermont, je suis sûre que tu vas plus vouloir en partir ». Tu avais raison. Tout ça, c'est grâce à toi. **Eva, Geoffrey, Julien, Clara**, merci pour les soirées, les restos et les sorties en votre compagnie. Une pensée pour **Romain**. Merci à **Théo** et **Sacha**, les copains Québécois. **Théo**, je te passe le flambeau, j'ai hâte de voir ton travail sur les paires de Lewis frustrées.

Et bien entendu, je ne trouverai jamais assez de mots pour remercier **tous les membres de ma famille** pour leur soutien sans faille. En particulier, **Maman, Papa, Abdel** et **Clarisse**, merci d'avoir toujours été présents et de m'avoir encouragée à poursuivre mes études, c'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui. Merci à mes frères et sœurs **Andy, Priscilia** et **Lalie** pour votre soutien, j'espère que vous apprécierez vos études supérieures autant que moi. Une pensée pour mes **grands-parents**, et particulièrement à **Papou**. Merci à ma **belle-famille**, qui a toujours eu le courage de s'intéresser à mes recherches, même si bien souvent mes réponses n'étaient pas des plus claires. Pour finir, j'adresse le plus grand de tous les mercis à mon chéri, **Hugo**, qui me supporte au quotidien. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, pour ton implication et pour tout le bonheur que tu m'as apporté au cours de ces 8 années d'études. Rien n'aurait été possible sans toi ♥♥♥.

Au vu de votre grand nombre, je préfère ne pas faire d'impair en omettant accidentellement l'un d'entre vous, ainsi j'adresse aussi mes remerciements à toutes les personnes que j'aurai pu oublier...ne m'en voulez pas !

Table des matières

Résumé	
Liste des abréviations	
Index des figures	
Index des tableaux	

Première partie : Synthèse Bibliographique

I. La maladie de Crohn.....	1
I.1 Généralités et épidémiologie	1
I.2 Facteurs étiologiques de la maladie de Crohn	2
I.2.1 Facteurs génétiques et épigénétiques	2
I.2.1.1 Gènes impliqués dans la régulation de la fonction de barrière intestinale .	2
I.2.1.1.1 Organisation et fonctions de la barrière épithéliale intestinale	2
I.2.1.1.2 Fonction de barrière épithéliale intestinale et maladie de Crohn.....	4
I.2.1.2 Gènes impliqués dans la régulation des réponses immunitaires	5
I.2.1.2.1 Dérégulation de la réponse immunitaire chez les patients Crohn	5
I.2.1.2.2 Gènes régulant les réponses immunitaires innées.....	5
I.2.1.2.3 Gènes régulant les réponses immunitaires adaptatives	8
I.2.1.3 Régulation de l'expression des gènes et facteurs épigénétiques.....	8
I.2.1.3.1 Interactions de la chromatine	9
I.2.1.3.2 Méthylation de l'ADN	9
I.2.1.3.3 Modifications des histones.....	10
I.2.1.4 Transcriptome et MICI	10
I.2.1.4.1 Les ARN messagers	10
I.2.1.4.2 Les ARN non codants	11
I.2.2 Facteurs environnementaux	14
I.2.2.1 Facteurs de risque	14
I.2.2.1.1 Tabagisme	14
I.2.2.1.1 Régime, additifs alimentaires et polluants environnementaux	15
I.2.2.1.1 Traitements médicamenteux et chirurgical	15
I.2.2.1.2 Hypothèse hygiéniste	16
I.2.2.1.3 Gradient Nord-Sud.....	17
I.2.2.2 Facteurs protecteurs	17
I.2.2.2.1 Allaitement.....	17
I.2.2.2.2 Activité physique	17
I.2.2.2.3 Alimentation	17
I.2.3 Facteurs microbiens	18
I.2.3.1 Rôle du microbiote intestinal	18
I.2.3.2 Microbiote intestinal et maladie de Crohn.....	18
I.2.3.2.1 Le microbiote bactérien	18
I.2.3.2.2 Les microbiotes viral et fongique.....	20
I.2.3.2.3 Interactions entre microbiote et facteurs génétiques.....	21
I.2.3.3 Implication d'agents pathogènes dans le développement de la MC	22
I.2.3.3.1 Implication d'un agent viral.....	22
I.2.3.3.2 Implication de microorganismes fongiques	23

I.2.3.3.3	Implication de bactéries pathogènes	24
I.3	Marqueurs diagnostiques et stratégies thérapeutiques.....	26
I.3.1	Diagnostic de la maladie de Crohn	26
I.3.2	Marqueurs diagnostiques	27
I.3.2.1	Les marqueurs protéiques et organiques	27
I.3.2.2	Les microARN	28
I.3.3	Traitements cliniques conventionnels.....	29
I.3.4	Approches thérapeutiques ciblant les agents infectieux	31
I.3.4.1	Antibiotiques.....	31
I.3.4.2	Prébiotiques, probiotiques et symbiotiques	31
I.3.4.3	Transplantation de microbiote fécal.....	32
I.3.4.4	Potentiel thérapeutique des miARN.....	33
II.	<i>Escherichia coli</i> adhérents et invasifs et maladie de Crohn.....	34
II.1	Le pathovar AIEC associé à la maladie de Crohn	34
II.1.1	Généralités	34
II.1.2	Prévalence chez les patients atteints de MC	34
II.2	Caractéristiques pathogènes des AIEC	35
II.2.1	Traversée de la couche de mucus	35
II.2.2	Interaction des AIEC avec les cellules épithéliales intestinales	35
II.2.2.1	Adhésion aux cellules épithéliales intestinales	36
II.2.2.2	Invasion des cellules épithéliales intestinales	38
II.2.2.3	Déstabilisation de la fonction de barrière par les AIEC.....	39
II.2.3	Interaction des AIEC avec les cellules immunitaires	40
II.2.4	Induction de la production de cytokines pro-inflammatoires par les AIEC ..	41
II.2.5	Modulation du microbiote intestinal par les AIEC	41
II.2.6	Induction de la sécrétion d'exosomes à potentiel pro-inflammatoire et favorisant la réplication intracellulaire des AIEC par les cellules infectées	42
II.3	Facteurs extrinsèques et intrinsèques à l'hôte modulant la réplication intracellulaire des AIEC.....	43
II.4	Stratégies thérapeutiques ciblant les AIEC.....	44
III.	L'autophagie	45
III.1	Généralités	45
III.2	Mécanisme moléculaire de la macro-autophagie	46
III.2.1	L'initiation.....	46
III.2.2	L'élongation	47
III.2.3	La maturation et la dégradation du contenu par le lysosome	48
III.3	Régulation du processus macro-autophagique	49
III.3.1	L'induction de l'autophagie par les complexes protéiques	49
III.3.2	Régulation transcriptionnelle	50
III.3.3	Régulation post-transcriptionnelle	51
III.3.4	Régulation post-traductionnelle	52
III.3.4.1	La phosphorylation	52
III.3.4.2	L'ubiquitinylation	53
III.3.4.3	L'acétylation	54
III.3.4.4	La SUMOylation.....	55
III.4	Autophagie et réponse aux bactéries intracellulaires : la xénophagie	55

III.4.1	Les récepteurs de la xénophagie.....	55
III.4.2	L'interaction entre les bactéries et la xénophagie	56
III.4.2.1	Le contrôle des bactéries par la xénophagie	57
III.4.2.2	L'échappement des bactéries à la machinerie autophagique	57
III.4.2.2.1	Evitement de la reconnaissance par la machinerie autophagique ..	57
III.4.2.2.2	Inhibition de l'induction de l'autophagie	58
III.4.2.3	L'utilisation de l'autophagosome comme niche de réplication	58
III.4.2.4	Modulation des miARN de l'hôte contrôlant l'autophagie.....	59
III.5	Autophagie, physiopathologie intestinale et maladie de Crohn	60
III.5.1	Généralités.....	60
III.5.2	Régulation de l'homéostasie intestinale par l'autophagie	61
III.5.2.1	Rôle de l'autophagie dans la fonction barrière de l'épithélium	61
III.5.2.2	Rôle de l'autophagie dans la mort cellulaire.....	61
III.5.2.3	Rôle de l'autophagie dans l'homéostasie des cellules de Paneth.....	62
III.5.3	Influence de l'autophagie sur le microbiote intestinal	63
III.5.4	Autophagie et stress du réticulum endoplasmique	64
III.5.5	Autophagie et immunité innée	66
III.5.5.1	Modulation de l'activation de l'inflammasome par l'autophagie	66
III.5.5.2	Xénophagie et MC	68
III.5.6	Autophagie et immunité adaptative.....	70
III.5.6.1	Autophagie et présentation antigénique	70
III.5.6.2	Autophagie et activation des cellules T	71
III.5.7	Autophagie : vers des thérapies potentielles pour la MC	72
IV.	Les Exosomes	74
IV.1	Généralités	74
IV.2	Isolement et caractérisation des exosomes	75
IV.3	Biogenèse et capture des exosomes	77
IV.4	Composition moléculaire des exosomes.....	78
IV.4.1	Protéines.....	78
IV.4.2	Lipides.....	80
IV.4.3	Acides nucléiques	80
IV.5	Fonctions des exosomes	82
IV.5.1	Fonctions physiologiques des exosomes.....	82
IV.5.2	Exosomes et réponses immunitaires	83
IV.5.2.1	Réponses immunitaires innées	83
IV.5.2.2	Réponses immunitaires adaptatives	84
IV.5.3	Exosomes et infections.....	86
IV.5.4	Exosomes et MICI	89
IV.6	Exosomes : un outil diagnostique, pronostique et thérapeutique.....	90
IV.6.1	Exosomes : outils diagnostiques et pronostiques prometteurs	90
IV.6.2	Exosomes : outils thérapeutiques prometteurs.....	91
IV.6.2.1	Exosomes et modulation des réponses immunes en modèle animal.....	91
IV.6.2.1.1	Vaccination par les vésicules extracellulaires eucaryotes et procaryotes.....	91
IV.6.2.1.2	Potentiel thérapeutique des vésicules extracellulaires eucaryotes et procaryotes dans les MICI.....	93

IV.6.2.2 Exosomes et administration de molécules thérapeutiques	96
---	----

Deuxième partie : Travail Expérimental

I. Contexte scientifique	98
II. Résultats principaux obtenus	99
II.1 Identification du mécanisme moléculaire par lequel les exosomes augmentent la réplication intracellulaire des AIEC au sein des cellules réceptrices	99
II.2 Identification du ou des récepteur(s) autophagique(s) mis en jeu dans la reconnaissance des bactéries AIEC par l'autophagie	101
III. Discussion et perspectives	105
III.1 Identification du mécanisme moléculaire par lequel les exosomes exercent leurs effets au sein des cellules réceptrices	105
III.1.1 Objectif 1 : Etude du rôle des miARN exosomaux	105
III.1.1.1 Analyse du profil global en miARN dans les exosomes sécrétés par les cellules épithéliales intestinales infectées par les AIEC.....	105
III.1.1.2 Analyse du rôle des miARN exosomaux dans les cellules réceptrices..	105
III.1.1.3 Etude du rôle des miARN exosomaux dans la modulation de l'inflammation dans les macrophages humains.....	106
III.1.2 Objectif 2 : Analyse de l'impact des protéines contenues dans les exosomes sur les cellules réceptrices	107
III.2 Utilisation des exosomes comme approche diagnostique et thérapeutique	108
III.2.1 Utilisation des miARN exosomaux comme outil diagnostique pour identifier la présence d'AIEC chez les patients	108
III.2.2 Utilisation des exosomes comme vecteurs d'anti-miARN à visée thérapeutique.....	110
III.2.2.1 Mise au point de l'incorporation des anti-miARN dans les exosomes..	110
III.2.2.2 Etude de l'effet des exosomes contenant les anti-miARN sur la susceptibilité de l'hôte à l'infection par les bactéries AIEC	111
III.2.3 Utilisation des exosomes comme vaccin contre les bactéries AIEC	111
III.3 Identification du ou des récepteur(s) autophagique(s) mis en jeu dans la reconnaissance des AIEC par l'autophagie	113
IV. Conclusion générale	117
Troisième partie : Références.....	119

Quatrième partie : Annexes

Résumé

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique du tube digestif caractérisée par un état d'hyperactivation du système immunitaire intestinal. L'étiologie de cette maladie fait intervenir des facteurs environnementaux, génétiques et infectieux entraînant une réponse immunitaire aberrante. A ce jour, aucun traitement spécifique n'est disponible et de par ses conséquences invalidantes, sa nature chronique et récidivante et sa prévalence croissante, la MC représente un problème majeur de santé publique. Plusieurs groupes dont le nôtre ont rapporté une colonisation anormale de la muqueuse intestinale des patients atteints de MC par des bactéries *Escherichia coli* adhérentes et invasives dénommées AIEC. La caractérisation des bactéries AIEC a montré qu'elles sont capables de traverser la couche de mucus intestinal, de transloquer à travers l'épithélium au niveau des plaques de Peyer, de déstabiliser la fonction de barrière intestinale, de coloniser le tube digestif, de moduler le microbiote intestinal et d'induire une inflammation intestinale dans les modèles murins génétiquement prédisposés.

Des études menées par le laboratoire ont montré que l'autophagie est un mécanisme clé de la défense de l'hôte pour l'élimination des bactéries AIEC intracellulaires et la diminution de l'inflammation intestinale induite par ces dernières. Cependant, le ou les récepteur(s) autophagique(s) impliqué(s) dans le ciblage des AIEC aux autophagosomes ainsi que le mécanisme sous-jacent restent à identifier.

Il a été récemment montré au laboratoire que l'infection des cellules épithéliales intestinales par les bactéries AIEC induit la sécrétion d'exosomes capables d'activer les réponses immunes et d'augmenter la réplication intracellulaire des AIEC dans les cellules épithéliales intestinales et les macrophages receveurs. Cependant, les mécanismes sous-tendant les effets des exosomes dans les cellules réceptrices restent à identifier.

Les travaux menés au cours de cette thèse visent à identifier (i) le mécanisme moléculaire par lequel les exosomes augmentent la réplication intracellulaire des AIEC dans les cellules réceptrices et (ii) le ou les récepteur(s) autophagique(s) mis en jeu dans le ciblage des AIEC à la machinerie autophagique.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en lumière le transfert de miARN spécifiques, les miR-30c et miR-130a, de cellules en cellules *via* les exosomes afin d'inhiber la réponse autophagique de l'hôte, favorisant ainsi la colonisation par les AIEC. De plus, bien que préliminaires, nos données ont montré que certains récepteurs autophagiques se lient d'une part aux AIEC et d'autre part aux vésicules autophagiques, permettant ainsi la reconnaissance et par conséquent la dégradation de ces bactéries par la machinerie autophagique.

Ensemble, ces études contribueront à la compréhension des multiples aspects de l'interaction entre l'hôte et les bactéries AIEC pathogènes associées à MC et permettront à l'avenir de mieux comprendre la pathogenèse de cette maladie afin d'en faciliter le diagnostic et le traitement.

Mots clés : Maladie de Crohn, *Escherichia coli* adhérents et invasifs, exosomes, autophagie, miARN.

Liste des abréviations

- 4C-seq**, chromosome conformation capture-on-chip-sequencing
AGO, argonaute
AHR, récepteur aryl hydrocarbure humain
AIEC, adherent-invasive *E. coli*
AIM2, absent in melanoma 2
ALIX, apoptosis-linked gene 2-interacting protein X
AMBRA1, autophagy and Beclin 1 regulator 1
AMPK, adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase
ANRIL, antisense noncoding RNA in the INK4 locus
APEC-01, avian pathogenic *E. coli* strain 01
ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ASCA, anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies
ATF, activating transcription factor
ATG, autophagy-related gene
ATG16L1, autophagy-related gene 16 like 1
BCG, Bacille de Calmette et Guérin
BCL, B-cell lymphoma
BECN1, beclin 1
BMDC, cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse
BNIP3, Bcl-2 19-kDa interacting protein 3
BNIP3L, BNIP3-like
C1orf106, chromosome 1 open reading frame 106
CACNA2D3, voltage-dependent calcium channel subunit α -2/ δ -3
CagA, cytotoxin-associated gene A
CALCOCO2, calcium binding and coiled-coil domain 2
CARD15, caspase activated recruitment domain-15
CARD9, caspase recruitment domain family member 9
CCR6, C-C chemokine receptor type 6
CDC42, Cell Division Cycle 42
CDH1, cadhérine 1
CEACAM, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules
CFP, culture filtered proteins
CFSE, Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CLDN, claudine
CMA, chaperone-mediated autophagy
CMH, complexe majeur d'histocompatibilité
CMV, cytomégalovirus
CPA, cellules présentatrices d'antigènes
Cps14, capsular polysaccharide 14
CREB1, CAMP responsive element binding protein 1
CXCL1, C-X-C Motif Chemokine Ligand 1
DAPK, death associated protein kinase
DDIT3, DNA-damage-inducible transcript 3
DFCP1 zinc-finger FYVE domain-containing protein 1
DGCR8, DiGeorge syndrome critical region gene 8
DOR, diabetes and obesity-regulated gene
DRAM2, DNA damage regulated autophagy modulator 2
DSS, dextran sulfate de sodium
E2F1, eukaryotic translation elongation transcription factor 1,
EIF2AK4, eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4
EIF2 α , eukaryotic translation initiation factor 2 alpha
ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay
EMV, endosomes multivésiculaires
EpCAM, epithelial cell adhesion molecule
ERK2, extracellular signal-regulated kinase 2
ESCRT, endosomal sorting complexes required for transport
ESPEN, European Society for Parenteral and Enteral Nutrition
ESX-1, 6-kDa early secretory antigenic target (ESAT-6) secretion system 1
EWAS, epigenome-wide methylation association studies
FAK, focal adhesion kinase
FBXL20, F-Box And Leucine Rich Repeat Protein 20
FIP200, FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa
FLISA, fluorophore-linked immunosorbent assay
FOXO3, forkhead box O 3
FOXP3, forkhead box P3
FPR, formyl peptide receptor
GABARAP, gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein
GALR3, galanin receptor 3
GALT, gut associated lymphoid tissue
GAPDH, D-glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GATA3, GATA-binding protein 3
GCN2, general control nonderepressible 2
GDNF, glial cell derived neurotrophic factor
GIPA, growth in Peyer's patches
GSK3, glycogen synthase kinase-3
GWAS, genome-wide association study
HDAC, histones déacétylase
HLA, human leukocyte antigen

HMG, high mobility group
hnRNPA2B1, ribonucléoprotéine hétérogène A2B1
HSP70, heat shock protein 70
HSP90 heat-shock protein 90
HuR, human antigen R
ICAM1, intercellular adhesion molecule 1
IFN, interféron
Ig, immuoglobulines
IgAs, IgA sécrétoires
IKK- α , I κ B kinase α
IL, interleukine
IL10R, récepteur de à l'IL-10
IL2RA, IL2 Receptor subunit alpha
IL6ST, IL6 signal transducer
IRE1 α , inositol-requiring enzyme 1 α
IRGM, immunity-related GTPase family M
ITGB2, integrin subunit beta 2
ITLN1, intélectine 1
JAK2, Janus kinase 2
JAM-A, junctional adhesion molecule-A
JNK, c-Jun N-terminal kinase
KAP1, KRAB-associated protein-1
KLHL20, kelch like family member 20
KRAS, V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LAMP1, lysosome-associated membrane glycoprotein 1
LAMP2A, lysosome-associated membrane protein type 2A
LC3, light chain 3
LIR, LC3-interacting region
lncRNAs, long non-coding RNAs
LPF, long polar fimbriae
LPS, lipopolysaccharide
LRRK2, leucine rich repeat kinase 2
LRSAM1, leucine rich repeat and sterile alpha motif containing 1
LTB₄, leucotriène B4
MAP, *Mycobacterium avium* sous-espèce *paratuberculosis*
MAP1LC3, microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
MAPK, mitogen-activated protein kinases
MC, maladie de Crohn
MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1
MDP, muramyl dipeptide
ME, microscopie électronique
MFGE8, milk fat globule-epidermal growth factor factor 8 protein
miARN ou miR, microARN
MICI, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MLC, myosin light chain
MLCK, myosin light chain kinase
mTOR, mammalian target of rapamycin
mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1
MUC, mucin
MUL1, mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1
MYD88, myeloid differentiation primary response gene 88
NBR1, next to BRCA1 gene 1 protein
NDP52, nuclear dot protein 52
NEDD4L, NEDD4 Like E3 ubiquitin protein ligase
NF- κ B, nuclear factor-kappa B
NK, natural killer
NKG2D, natural killer group 2 member D
NLR, Nod-like receptors
NLRP, NLR family pyrin domain containing
NMEC S88, meningitis-associated *E. coli* strain S88
NOD2, nucleotide-binding oligomerization domain 2
NSUN2, NOP2/Sun RNA methyltransferase 2
Omp, outer membrane porin
OMV, outer membrane vesicles
OPTN, optineurine
OSM, oncostatine M
OVA, ovalbumine
PAMP, pathogen-associated molecular patterns
pANCA, perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies
PBMC, peripheral blood mononuclear cell ou cellules mononucléaires du sang périphérique
PDL-1, programmed death-ligand 1
PE, phosphatidyléthanolamine
PERK, protein kinase R-like endoplasmic reticulum *kinase*
PI(3)P, phosphatidylinositol-3-phosphate
PIAS γ , protein inhibitor of activated STAT protein γ
PIK3C3, phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3
PIK3R4, PI3K regulatory subunit 4
PKA, protéine kinase A
PKB, protéine kinase B
PKC β , protéine kinase C β
pMLC, MLC phosphorylée
PPAR γ , peroxysome proliferator activated receptor γ
pré-miARN, microARN précurseur
pri-miARN, microARN primaire
PRKAA1, protein kinase amp-activated catalytic subunit alpha 1
PRR, pathogen recognition receptors
PSA, polysaccharide A
PSMA7, proteasome subunit alpha type 7

PTPN2, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2
PTPN22, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22
RAB2A, Ras-related protein Rab-2A
RAGE, receptor for advanced glycation end products
RANTES, regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RAPTOR, regulatory-associated protein of mTOR
RCH, rectocolite hémorragique
RE, réticulum endoplasmique
RIPK2, receptor [TNFRSF]-interacting serine-threonine kinase 2
RISC-miRNP, RNA-induced silencing complex-micro-ribonucleoprotein
ROR γ t, retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ t
ROS, reactive oxygen species
Runx1, runt-related transcription factor 1
S1P, sphingosine-1-phosphate
SCV, *Salmonella*-containing vacuole
SENP3, sentrin-specific protease 3
shRNA, small hairpin RNA
SIAH2, Seven in absentia homolog 2
SIF, *Salmonella*-induced filament
SIRT1, sirtuine 1
SMAD3, SMAD family member 3
SNARE, soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors
SNP, single nucleotide polymorphism
SOCS3, suppressor of cytokine signaling 3
SOX2, SRY (sex determining region Y)-box 2
SQSTM1, sequestosome 1
SREBF/B, sterol regulatory element-binding transcription factor / protein
STAT, signal transducer and activator of transcription
STUB1, STIP1 homology and U-Box containing protein 1
SYNCRIP, synaptotagmin-binding cytoplasmic RNA-interacting protein
T3SS, système de sécrétion de type III
T4SS, système de sécrétion de type IV
T6SS, système de sécrétion de type VI
TAX1BP1, tax1 binding protein 1
TBK1, TANK-binding kinase 1
TBKBP1, TBK1 binding protein 1
TECPR1, tectonin beta-propeller repeat containing 1
TFEB transcription factor EB
TGF β , transforming growth factor β
Th, T helper
TIRAP, TIR domain containing adaptor protein
TLR, Toll-like receptor
TMEM173, transmembrane protein 173
TNBS, acide sulfonique 2,4-trinitrobenzène
TNF, tumor necrosis factor
TRAF, TNF receptor-associated factor
TRAIL, tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand
Treg, T régulateur
TREM1, triggering receptor expressed on myeloid cells
TRIF, TIR [Toll/interleukin 1 receptor] domain-containing adaptor protein
TSC, tuberous sclerosis complex
TSG101, tumor susceptibility gene 101
TXK, tyrosine kinase
ULBP1, UL16 binding protein 1
ULK, unc-51 like autophagy activating kinase
UPEC UTI89, uropathogenic *E. coli* strain UTI89
UTR, untranslated region
UVRAG, UV radiation resistance-associated gene
VIL, vésicules intra-luminales
VMP1, vacuole membrane protein 1
VPS15, vacuolar protein sorting protein 15
VPS34, vacuolar protein sorting protein 34
Wip1, WPP domain interacting protein 1
WIPI, WD repeat protein interacting with phosphoinositides
XBPI1, X-box binding protein 1
YAP, yes-associated protein 1
YB-1, Y-box binding protein 1
ZBTB16, Zinc Finger And BTB Domain Containing 16
ZKSCAN3, zinc finger protein with krab and scan domains 3
ZO, zonula occludens

Index des figures

Figure 1 : Principales différences entre la MC et la RCH.

Figure 2 : Incidence, prévalence et répartition géographique de la MC dans le monde entre 1990 et 2016.

Figure 3 : Modèle des voies impliquées dans les MICI basées sur les études GWAS.

Figure 4 : Organisation de la barrière et du système immunitaire intestinal.

Figure 5 : Organisation des jonctions intercellulaires au niveau de l'épithélium intestinal.

Figure 6 : Différenciation des lymphocytes T CD4⁺ et profil d'expression de cytokines.

Figure 7 : Activation des récepteurs TLR et réponse immunitaire innée.

Figure 8 : Signalisation consécutive à l'activation du récepteur IL-23R conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17.

Figure 9 : Biogenèse et maturation des microARNs.

Figure 10 : Vue d'ensemble des facteurs environnementaux impliqués dans les MICI.

Figure 11 : Diversité et densité des espèces microbiennes dominantes dans les différentes régions du tractus gastro-intestinal.

Figure 12 : Réduction de la diversité du microbiote intestinal chez des patients atteints de MC.

Figure 13 : Signature bactérienne de la MC basée sur 8 genres bactériens.

Figure 14 : Approche thérapeutique dans le traitement de la maladie de Crohn.

Figure 15 : Clichés de microscopie électronique à transmission de cellules épithéliales Hep-2 infectées par la souche *E. coli* LF82.

Figure 16 : Vésicules de membrane externe.

Figure 17 : Altération de la barrière épithéliale intestinale par la souche d'*E. coli* LF82.

Figure 18 : Effets des AIEC sur les protéines de jonction majeures et voies régulatrices dans les cellules épithéliales.

Figure 19 : Clichés de microscopie électronique à transmission de macrophages J774-A1 infectés par la souche *E. coli* LF82.

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

Figure 21 : Trois types d'autophagie présents dans les cellules mammifères.

Figure 22 : Le processus macro-autophagique.

Figure 23 : L'initiation de la formation des autophagosomes.

Figure 24 : Les microARNs au cours du processus macro-autophagique.

Figure 25 : Modifications post-traductionnelles et régulations des complexes ULK1 et Beclin 1.

Figure 26 : Régulation de l'autophagie par acétylation de protéines non histones.

Figure 27 : Rôle des récepteurs autophagiques dans le ciblage des bactéries au phagosome.

Figure 28 : Les bactéries contrôlées par l'autophagie.

Figure 29 Les bactéries qui échappent à l'autophagie.

Figure 30 : Les bactéries inhibant l'induction de l'autophagie.

Figure 31 : Modulation des miARN de l'hôte contrôlant la machinerie autophagique par les bactéries.

Figure 32: Rôle de l'autophagie dans la maintenance de l'homéostasie intestinale et mécanismes potentiels par lesquels une autophagie défectueuse pourrait contribuer au développement des MICI.

Figure 33 : Représentation schématique des principales vésicules extracellulaires.

Figure 34 : Biogenèse des exosomes.

Figure 35 : Biogenèse des exosomes, internalisation et réponse de la cellule réceptrice.

Figure 36 : Structure et composition d'un exosome.

Figure 37 : Exemple d'enrichissement des lipides dans les cellules de cancer de la prostate (PC-3) et dans les exosomes sécrétés par les cellules PC-3.

Figure 38 : Mécanismes suggérés pour l'incorporation des ARN dans les exosomes.

Figure 39 : Rôle des exosomes dans le recrutement des neutrophiles au cours d'une infection.

Figure 40 : Implication des exosomes dans la modulation des réponses immunitaires.

Figure 41 : Exosomes et infections bactériennes.

Figure 42 : Vésicules extracellulaires et MICI.

Figure 43 : Représentation des méthodes de chargement des molécules thérapeutiques dans les exosomes.

Figure 44 : Plan récapitulatif des perspectives du projet de thèse.

Index des tableaux

Tableau 1 : Bilan des miARN dérégulés entre les tissus inflammés et les tissus non inflammés chez les patients atteints de MC.

Tableau 2 : Changements du microbiote fongique observés chez les patients adultes comparativement aux sujets sains ou à leurs parents non atteints.

Tableau 3 : Changements du microbiote fongique observés chez les patients pédiatriques comparativement aux sujets sains ou à leurs parents non atteints.

Tableau 4 : Diagnostic différentiel de la MC et de la RCH.

Tableau 5 : Bilan des miARN dérégulés au niveau circulant chez les patients atteints de MC.

Tableau 6 : Bilan des miARN dérégulés au niveau tissulaire chez les patients atteints de MC.

Tableau 7 : Facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'autophagie.

Tableau 8 : Caractéristiques physico-chimiques des principaux types de vésicules extracellulaires.

Tableau 9 : Principales méthodes de purification des vésicules extracellulaires.

Tableau 10 : Principales méthodes d'analyse des vésicules extracellulaires.

PREMIÈRE PARTIE

– Synthèse Bibliographique –

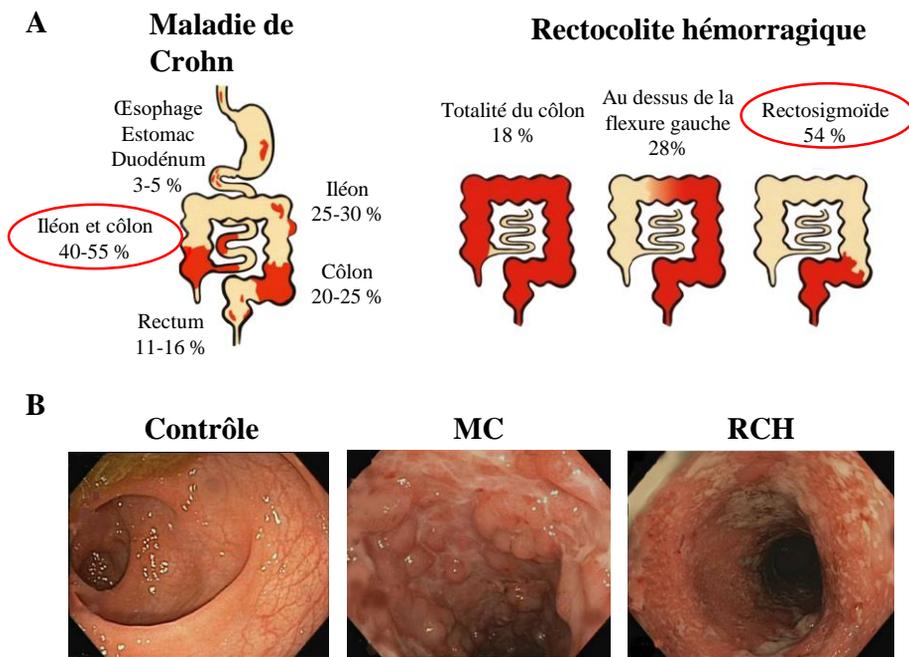


Figure 1 : Principales différences entre la MC et la RCH.

A. La MC peut toucher la totalité du tube digestif, avec une localisation préférentielle au niveau de l'iléon terminal alors que les lésions de la RCH se limitent au côlon et au rectum (modifiée d'après Inflammatory Bowel Disease, practice manual, 2004).

B. L'endoscopie permet parfois de distinguer les ulcérations de la paroi intestinale indiquant une MC, des lésions continues et granuleuses étant caractéristiques de la RCH (Shapiro *et al.*, 2016)

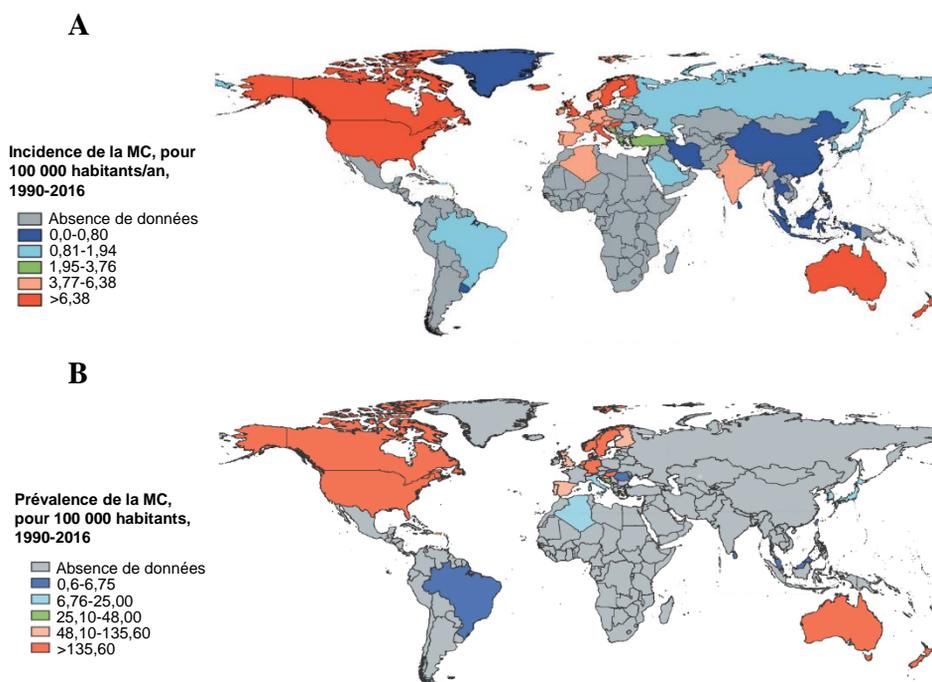


Figure 2 : Incidence, prévalence et répartition géographique de la MC dans le monde entre 1990 et 2016.

A. Les incidences sont indiquées en nombre de personnes/an/100 000 habitants. **B.** Les prévalences sont indiquées en nombre de personnes/100 000 habitants (modifiée d'après Ng *et al.*, 2017).

I. La maladie de Crohn

I.1 Généralités et épidémiologie

La maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) appartiennent au groupe des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). La MC est caractérisée par une atteinte segmentaire et transmurale de la paroi digestive, pouvant toucher l'ensemble du tractus gastro-intestinal de la bouche à l'anus avec une atteinte préférentielle de l'iléon terminal et du côlon. La RCH se caractérise quant à elle par une inflammation chronique strictement localisée au niveau du rectum et du côlon (Zhang and Li, 2014) (**Figure 1A**). C'est en 1932 que Burrill B. Crohn, médecin new-yorkais, donna son nom à la MC en décrivant 14 cas d'une pathologie d'origine inconnue appelée alors « Iléite Terminale ou Régionale » et localisée à la moitié terminale de l'iléon (Crohn *et al.*, 1952). Au cours du siècle dernier, l'incidence et la prévalence de la MC ont fortement augmentées. La répartition de la MC dans le monde reste cependant très inégale, avec une incidence et une prévalence plus importantes dans les pays développés de l'Europe du Nord et de l'Amérique du Nord, bien que l'incidence de cette pathologie soit actuellement en augmentation dans les pays en voie de développement, en particulier en Afrique, en Asie et en Amérique du Sud (Ng *et al.*, 2017) (**Figure 2**).

La MC touche préférentiellement l'adulte entre 20 et 30 ans et a un fort retentissement sur la vie sociale et professionnelle des patients en raison des symptômes invalidants qu'elle entraîne. Ces signes cliniques évoluent par poussées d'intensité variable, se manifestant le plus souvent par une diarrhée chronique pouvant être associée à une douleur abdominale, une fatigue et une perte de poids, mais aussi des nausées, vomissements et ballonnements (Torres *et al.*, 2017). Ces symptômes peuvent être accompagnés de manifestations extra-intestinales telles qu'une arthrite ou une uvéite et sont entrecoupés de phases de rémission plus ou moins complètes et prolongées. L'examen endoscopique des patients révèle des lésions plurisegmentaires, discontinues, respectant des intervalles de muqueuse saine, touchant toute l'épaisseur de la paroi intestinale. Ces lésions ulcéreuses sont plus ou moins profondes et étendues selon la sévérité de la maladie, pouvant conduire à la formation de sténoses, d'abcès et de fistules (**Figure 1B**). Ces complications nécessitent fréquemment le recours à la chirurgie avec résection intestinale (Torres *et al.*, 2017). Les patients atteints de MC et ceux ayant une pathologie de type MICI en général, présentent un risque accru de développer un cancer colorectal par rapport à la population générale, vraisemblablement lié à la chronicité de l'inflammation intestinale (Axelrad *et al.*, 2016).

Aucun élément isolé ne permet à lui seul de poser le diagnostic de la MC, qui repose alors sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques, endoscopiques, radiologiques et histologiques, ainsi que sur l'évolution de ces signes dans le temps (Torres *et al.*, 2017). A ce jour, il n'existe pas

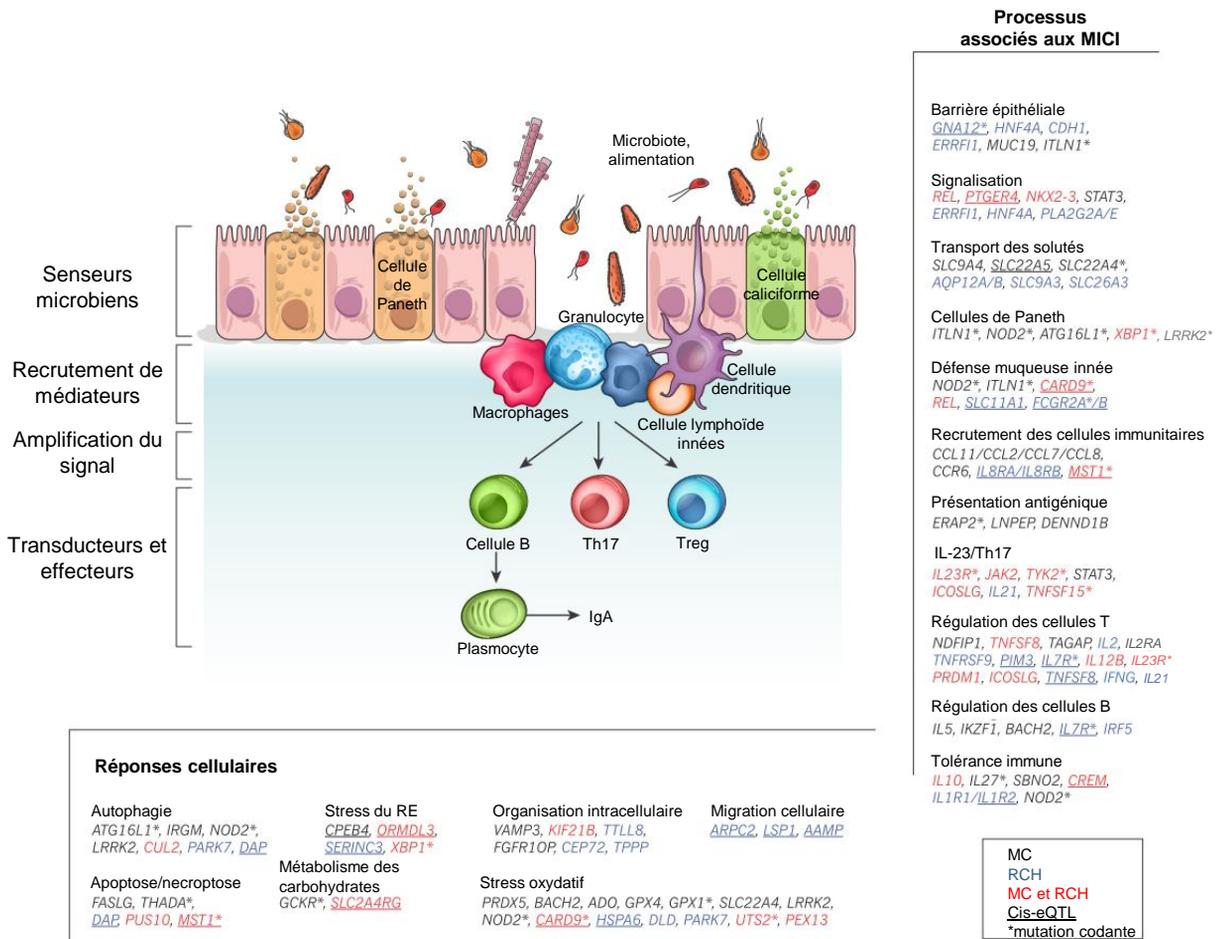


Figure 3 : Modèle des voies impliquées dans les MICI basées sur les études GWAS.

L'homéostasie intestinale met en jeu la coordination des cellules épithéliales et des cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. La perméabilité de la barrière permet la translocation des bactéries, qui sont détectées par le système immunitaire inné orchestrant alors les réponses tolérogéniques et inflammatoires en partie *via* la sécrétion de médiateurs extracellulaires recrutant d'autres types cellulaires, dont les cellules de l'immunité adaptative. Les variants génétiques, le microbiote et les facteurs immunitaires affectent la balance de ces signaux. Les gènes différemment exprimés ou porteurs de SNP associés aux MICI peuvent être classés selon leurs fonctions dans le contexte de l'homéostasie intestinale et de l'immunité. Ils peuvent avoir un impact dans des processus physiologiques associés aux MICI tels que le maintien de la barrière épithéliale, la physiologie des cellules de Paneth ou encore la régulation des cellules immunitaires, mais également dans les réponses cellulaires à un stress *via* l'autophagie, le stress du RE ou encore l'apoptose. La couleur du texte indique si les gènes sont associés à un risque accru de développer la MC (noir), la RCH (bleu) ou l'une ou l'autre de ces pathologies (rouge). Les astérisques indiquent la présence de mutations codantes. Les *loci* de traits quantitatifs d'expression (*cis*-eQTL ou *cis*-expression *Quantitative Trait Locus*), c'est-à-dire les gènes dont l'expression est diminuée ou augmentée dans les MICI, sont soulignés (modifiée d'après Khor *et al.*, 2011).

de traitement médical spécifique et susceptible de guérir définitivement la MC, mais seulement des traitements symptomatiques ayant pour but de contrôler les poussées, de limiter les récurrences et d'améliorer la qualité de vie des patients (Torres *et al.*, 2017).

I.2 Facteurs étiologiques de la maladie de Crohn

L'étiologie de la MC est complexe, faisant intervenir des facteurs génétiques, environnementaux et microbiens conduisant à la dérégulation du système immunitaire intestinal. Les interactions entre ces différents facteurs aboutissent à la mise en place d'une réponse inflammatoire non contrôlée à l'origine de la survenue, du maintien et/ou de l'aggravation de la MC.

I.2.1 Facteurs génétiques et épigénétiques

Plusieurs arguments sont en faveur d'une prédisposition génétique à la MC. Les études épidémiologiques indiquent que le risque de développer une MC lorsqu'un parent du premier degré est atteint est 10 à 21 fois plus élevé que dans la population générale, et la fréquence de formes familiales de MC peut atteindre 40 % lorsque les deux parents sont atteints. De même, la concordance de la MC est d'environ 20 à 55 % chez les jumeaux monozygotes alors qu'elle n'est que de 0 à 4 % chez les jumeaux dizygotes (Gordon *et al.*, 2015).

La génétique inverse utilisant des marqueurs génétiques de polymorphisme dont la localisation est connue sur le génome et plus récemment les études d'association à l'échelle du génome (GWAS, *genome-wide association study*) ont permis d'identifier environ 240 *loci* contenant une variation d'un seul nucléotide (SNP, *single nucleotide polymorphism*) associés à un risque accru de développer une MCI, dont 51 sont spécifiques à la MC (de Lange *et al.*, 2017). Ces gènes de susceptibilité codent pour des protéines impliquées dans des processus biologiques variés tels que la régulation de la fonction de barrière épithéliale intestinale, l'immunité innée, l'autophagie, le stress du réticulum endoplasmique (RE) et l'immunité adaptative (**Figure 3**). Les mécanismes reliant certains polymorphismes associés à un risque accru de développer la MC et l'apparition de cette maladie ont été largement décrits et seront détaillés dans cette partie.

I.2.1.1 Gènes impliqués dans la régulation de la fonction de barrière intestinale

I.2.1.1.1 Organisation et fonctions de la barrière épithéliale intestinale

L'épithélium intestinal est une barrière dynamique permettant la sécrétion d'enzymes digestives ainsi que l'absorption des nutriments, des électrolytes et de l'eau, tout en limitant l'accès des bactéries, parasites et virus aux tissus de l'hôte (Peterson and Artis, 2014). Il est composé d'une monocouche de cellules reposant sur la *lamina propria* via leur pôle basolatéral, étroitement liées entre elles par des jonctions serrées et recouvertes d'une couche de mucus contenant des

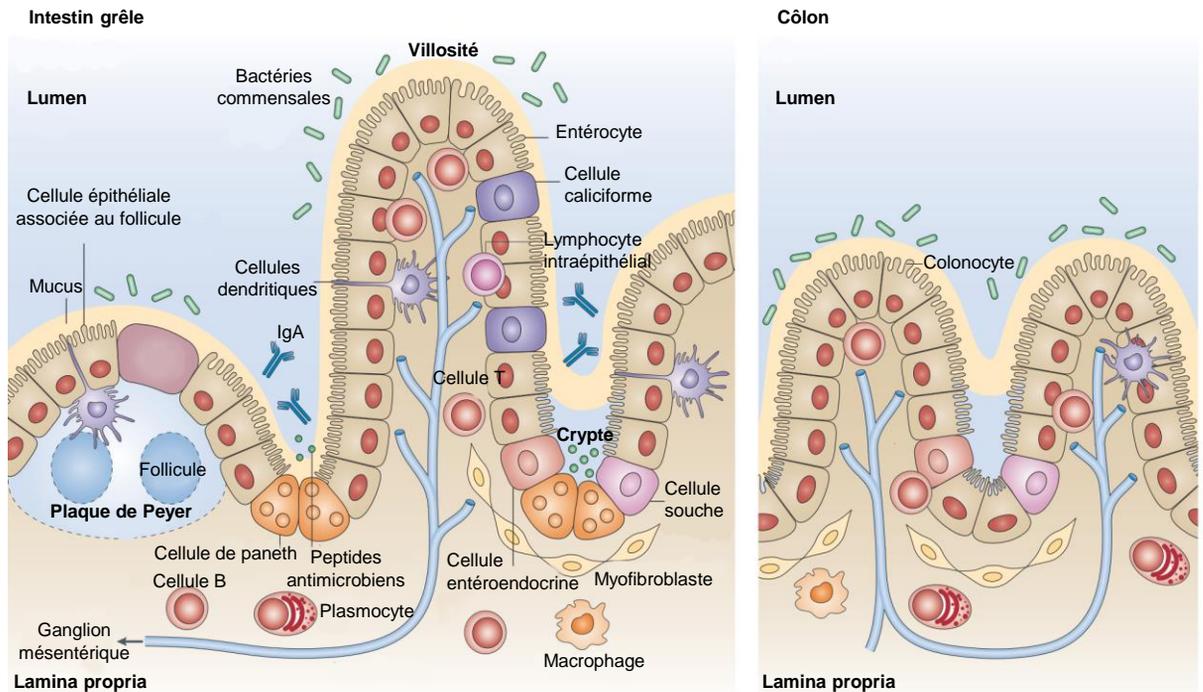


Figure 4 : Organisation de la barrière et du système immunitaire intestinal.

L'épithélium intestinal constitue une barrière physique qui permet de séparer le microbiote intestinal de la *lamina propria* sous-jacente. Il est constitué d'entérocytes, de cellules caliciformes impliquées dans la production de mucus, de cellules de Paneth spécialisées dans la production de peptides antimicrobiens et de cellules souches qui assurent le renouvellement cellulaire. Sous cette monocouche de cellules se trouve la *lamina propria*, composée de lymphocytes B, dont des plasmocytes producteurs d'IgA, des lymphocytes T, des macrophages et des cellules dendritiques. Au niveau de l'iléon se trouvent des plaques de Peyer, où les cellules M permettent l'échantillonnage du contenu luminal (modifiée d'après Abreu, 2010).

Immunoglobulines (Ig) A sécrétoires (IgAs) et de grandes concentrations de peptides antimicrobiens. Cet épithélium n'est pas totalement lisse mais est organisé en villosités permettant d'augmenter la surface de contact entre l'intestin et la lumière intestinale et en cryptes de Lieberkühn où sont localisées les cellules souches intestinales qui donneront naissance aux cellules différenciées assurant des fonctions particulières (Peterson and Artis, 2014). Les entérocytes constituent le type cellulaire majeur de l'épithélium intestinal et permettent l'absorption de l'eau et des nutriments par l'organisme tandis que les cellules caliciformes sécrètent du mucus composé à plus de 98 % d'eau et à environ 2 % de mucines dont la glycoprotéine majoritaire est la mucine (MUC) 2 et qui permet d'établir une barrière étanche aux bactéries. Les cellules de Paneth, retrouvées principalement au niveau de l'iléon, délivrent des peptides antimicrobiens tels que les défensines α et β , la phospholipase A2 sécrétoire, l'angiogénine, les cathélicidines et les lectines de type C, tandis que les cellules entéroendocrines libèrent des hormones. Enfin, les cellules M (ou microfold) sont retrouvées au niveau des plaques de Peyer et leur fonction sera détaillée plus loin (Peterson and Artis, 2014) (**Figure 4**).

Les cellules du système immunitaire intestinal jouent un rôle majeur dans la tolérance vis-à-vis du microbiote intestinal. Les macrophages de la sous-muqueuse assurent la phagocytose et l'élimination des bactéries commensales franchissant l'épithélium lors d'une altération de son intégrité (Ahluwalia *et al.*, 2017). Les cellules dendritiques régulent l'équilibre entre les différentes populations lymphocytaires et permettent l'induction des réponses immunitaires adaptatives en présentant des antigènes aux lymphocytes T. Même si ces réponses peuvent être observées tout le long de l'épithélium intestinal, les plaques de Peyer sont les structures spécialisées dans ce mécanisme (Ahluwalia *et al.*, 2017) (**Figure 4**).

Les plaques de Peyer sont des tissus lymphoïdes secondaires associés au tube digestif (GALT, *gut associated lymphoid tissue*) riches en lymphocytes B et T et en macrophages. Elles sont impliquées dans l'échantillonnage d'antigènes et de microorganismes de la lumière intestinale pour la présentation au système immunitaire sous-jacent (Da Silva *et al.*, 2017). L'entrée de nombreux antigènes à travers l'épithélium des plaques de Peyer se fait par les cellules M qui représentent 5 à 10 % des cellules épithéliales des plaques (Ohno, 2016). La réponse immunitaire initiée au niveau du GALT joue un rôle protecteur essentiel et permet le maintien de la tolérance vis-à-vis du microbiote. Cependant, les plaques de Peyer ne possèdent pas les récepteurs pour le transport des IgAs au niveau luminal, ce qui représente une fragilité de ces zones vis-à-vis des agressions par le microbiote et constituent ainsi une porte d'entrée pour certaines bactéries pathogènes telles que *Escherichia coli*, *Salmonella* et *Yersinia* (Ohno, 2016) (**Figure 4**).

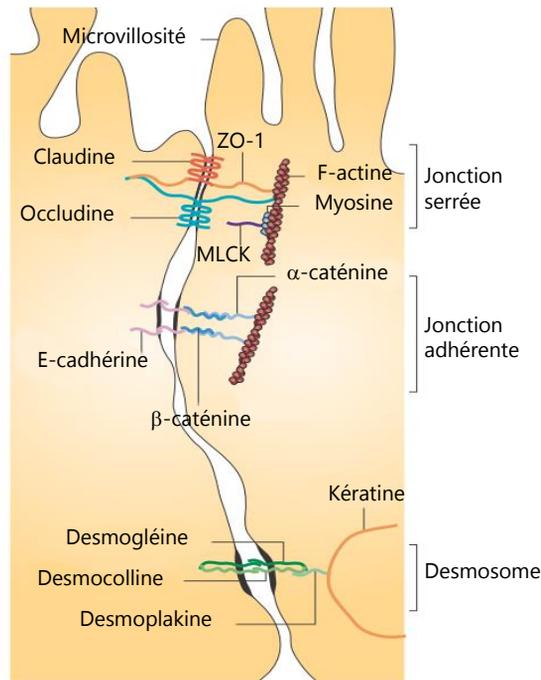


Figure 5 : Organisation des jonctions intercellulaires au niveau de l'épithélium intestinal.

L'épithélium intestinal est constitué d'une monocouche de cellules dont la cohésion est assurée par plusieurs types de jonctions intercellulaires, telles que les jonctions serrées, composées d'un complexe multiprotéique comprenant des protéines transmembranaires telles que les CLDN et l'occludine qui interagissent avec ZO (zonula occludens)-1, ZO-2 et l'actine du cytosquelette, les jonctions adhérentes, composées de protéines de la famille des cadhérines telles que l'E-cadhérine, la β -caténine, la caténine $\delta 1$ et l' α -caténine 1, mais également de protéines de la famille des nectines, et les desmosomes formés d'interactions entre la desmogléine, la desmocolline, la desmoplakine et les filaments de kératine du cytosquelette. MLCK, *myosin light chain kinase* (modifiée d'après Turner, 2009).

La cohésion de l'ensemble des cellules de l'épithélium intestinal est assurée par plusieurs types de jonctions intercellulaires (**Figure 5**). Les jonctions serrées, situées au pôle apical des cellules épithéliales jouent un rôle majeur dans la perméabilité membranaire en participant au contrôle des flux paracellulaires (Campbell *et al.*, 2017). Les jonctions adhérentes participent à la cohésion intercellulaire mais sont également impliquées dans le maintien de la polarisation, dans la différenciation cellulaire, ainsi que dans la communication intercellulaire (Campbell *et al.*, 2017). Enfin, les desmosomes participent à l'élasticité du tissu et permettent le passage de protéines, de lipopolysaccharide (LPS) bactérien, mais pas de bactéries entières (Nekrasova and Green, 2013).

I.2.1.1.2 Fonction de barrière épithéliale intestinale et maladie de Crohn

Une dysfonction de la barrière intestinale est définie comme étant la perte de la continuité de l'épithélium intestinal suite à une altération des jonctions intra-épithéliales. Cette altération, en rendant l'épithélium perméable aux microorganismes, aux antigènes et autres particules du lumen, entraîne l'activation du système immunitaire intestinal et la mise en place de l'inflammation pouvant conduire au développement de la MC (Michielan and D'Inca, 2015).

Une augmentation de la perméabilité intestinale a été démontrée chez une forte proportion de patients atteints de MC en phase active de la maladie et a été corrélée au risque de rechute (Michielan and D'Inca, 2015). Cette augmentation de la perméabilité serait due à une diminution du nombre et à une structure anormale des jonctions serrées, avec en particulier une diminution de l'expression de l'occludine et des claudines (CLDN) 5 et 8, une augmentation importante de l'expression de la CLDN2 et une forte apoptose des cellules épithéliales intestinales (Zeissig *et al.*, 2007). Lors des phases de rémission, la perméabilité intestinale est restaurée à un niveau normal (Michielan and D'Inca, 2015). Une augmentation de la perméabilité intestinale a également été observée chez les parents au premier degré de patients atteints de la MC (Michielan and D'Inca, 2015) et à la fois chez le jumeau sain et le jumeau atteint chez des paires de jumeaux discordants pour la MC (Keita *et al.*, 2018), suggérant que l'augmentation de la perméabilité intestinale serait un facteur précoce dans la pathogenèse de la MC, précédant le développement de l'inflammation et principalement causée par une prédisposition génétique.

De multiples polymorphismes à risque ont été identifiés au sein de gènes impliqués dans plusieurs processus clés de la fonction de barrière intestinale, tels que la régulation du mucus et des glycoprotéines [*MUC19* codant pour la mucine 19 (Danoy *et al.*, 2010) et *MUC3* codant pour la mucine 3 (Kyo *et al.*, 2001)], le transport membranaire (*ITLN1* codant l'intélectine 1) (Barrett *et al.*, 2008), l'adhésion cellulaire (*CDH1* codant la cadhérine 1) (Muisse *et al.*, 2009), et la stabilité des jonctions adhérentes (*Clorf106*, *chromosome 1 open reading frame 106*, codant une protéine non caractérisée) (Mohanani *et al.*, 2018). De plus, des mutations dans le *locus OSM*, codant pour

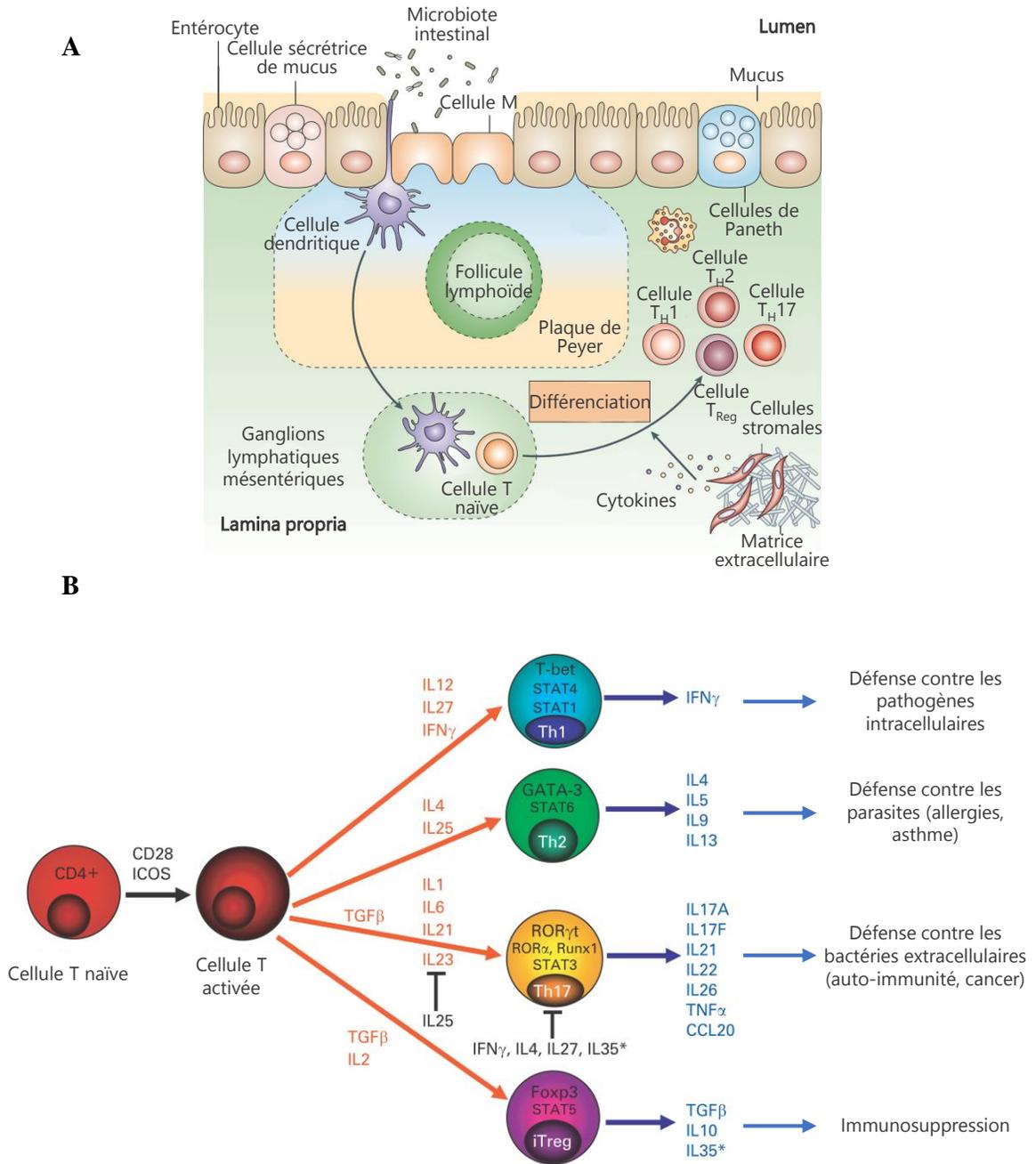


Figure 6 : Différenciation des lymphocytes T CD4⁺ et profil d'expression de cytokines.

A. Au niveau intestinal, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs sont situés au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques. Les cellules dendritiques associées à l'épithélium intestinal, en particulier au niveau des cellules M des plaques de Peyer et des follicules lymphoïdes, ont une forte activité d'endocytose et présentent les antigènes échantillonnés à partir du contenu luminal (bactéries par exemple). Elles migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques mésentériques et participent à la différenciation des T CD4⁺ naïfs en cellules Th1, Th2, Th17 ou Treg qui gagnent alors la *lamina propria*. **B.** Les lymphocytes T CD4⁺ se différencient en fonction de l'environnement cytokinique. Chaque sous-population (Th1, Th2, Th17 et Treg) sécrète un profil de cytokines caractéristique et exprime des facteurs de transcription caractéristiques. ROR, *retinoic acid receptor-related orphan receptor* ; Runx1, *runt-related transcription factor 1* (modifiée d'après Cho, 2008 et Brand, 2009).

la cytokine pro-inflammatoire oncostatine M (OSM), confèrent un risque plus important de développer la MC (West *et al.*, 2017). L'OSM est principalement exprimée par les cellules hématopoïétiques et jouerait un rôle dans la réparation de l'épithélium, probablement en favorisant la prolifération des cellules épithéliales intestinales (Pothoven and Schleimer, 2017). Une augmentation du niveau d'expression d'OSM et de son récepteur (OSMR) a été décrite chez les patients atteints de MC active et une forte expression de cette cytokine avant traitement a été associée à une résistance des patients au traitement par les anticorps anti-TNF (*tumor necrosis factor*)- α (West *et al.*, 2017).

I.2.1.2 Gènes impliqués dans la régulation des réponses immunitaires

I.2.1.2.1 Dérégulation de la réponse immunitaire chez les patients Crohn

La MC est caractérisée par un état d'hyperactivation du système immunitaire qui pourrait être la conséquence d'une dérégulation de la réponse immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale (Torres *et al.*, 2017). L'activation de l'immunité innée suite à une stimulation bactérienne fait intervenir différents récepteurs reconnaissant des bactéries ou des produits bactériens (PRR, *pathogen recognition receptors*) tels que des récepteurs *Nod-like* (NLR, *Nod-like receptors*) cytoplasmiques et des récepteurs *Toll-like* (TLR, *Toll-like receptors*) transmembranaires (Brubaker *et al.*, 2015). L'inflammation intestinale se traduit par un recrutement et une activation des lymphocytes et des macrophages, ainsi que par une infiltration de cellules polynucléaires neutrophiles, d'éosinophiles, de monocytes et de mastocytes (Ahluwalia *et al.*, 2017). La libération consécutive de cytokines solubles et d'autres médiateurs de l'inflammation amplifie la réponse immunitaire locale, responsable des lésions tissulaires. Les cytokines pro-inflammatoires libérées en grande quantité dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MC régulent la polarisation des lymphocytes T naïfs précurseurs vers le phénotype Th (*T helper*) 1, Th2 ou Th17 lors de leur activation (Brand, 2009) (**Figure 6 A et B**). En raison du rôle avéré des cytokines TNF- α et interféron (IFN)- γ ainsi que des interleukines (IL)-1 β , IL-6 et IL-23 durant la phase chronique de la pathologie, la MC est considérée comme une pathologie de type Th1/Th17 (Brand, 2009).

I.2.1.2.2 Gènes régulant les réponses immunitaires innées

Le système immunitaire inné, non spécifique, représente la première ligne de défense contre les pathogènes et permet à l'organisme de répondre rapidement à un stimulus. Trois processus majeurs de l'immunité innée ont émergé des GWAS et méta-analyses menées dans le cadre de la MC et semblent prépondérants dans le développement de la MC : la détection des pathogènes avec les récepteurs TLR et NLR, l'autophagie permettant l'élimination des pathogènes et le stress du RE permettant aux cellules de répondre à l'accumulation de protéines mal repliées.

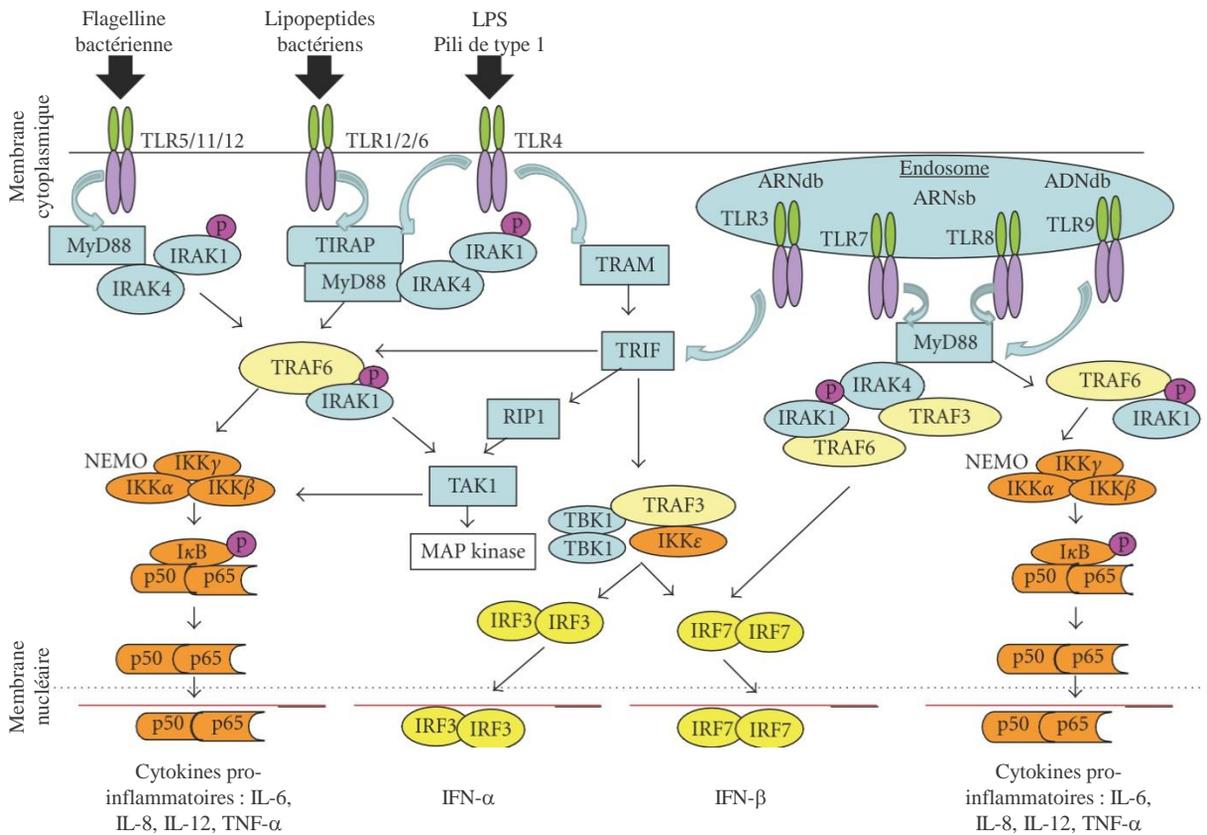


Figure 7 : Activation des récepteurs TLR et réponse immunitaire innée.

Au niveau de la membrane plasmique sont retrouvés le TLR5, pouvant se dimériser avec le TLR11 ou le TLR12 et reconnaissant la flagelline bactérienne, le TLR1, pouvant se dimériser le TLR1 ou le TLR6 et reconnaissant différents constituants bactériens (peptidoglycane, lipoprotéines et lipopeptides triacylés ou diacylés), et le TLR4 reconnaissant le LPS ainsi que les *pili* de type 1 bactériens. Au niveau de l'endosome sont retrouvés les TLR 3, 7, 8 et 9. Le TLR3 reconnaît des molécules virales d'ARN double brin (db), les TLR7/8 permettent la reconnaissance de molécules d'ARN simple brin (sb). Enfin, le TLR9 est activé par des îlots CpG d'ADN bactérien ou viral. L'activation des TLR déclenche l'activation des voies de signalisation par l'intermédiaire des protéines adaptatrices (TIRAP, MyD88, TRIF ou TRAM) conduisant à l'activation de la transcription de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8 et IL-12) et l'IFN- α et β (modifiée d'après Zhu et Mohan, 2010)

Les récepteurs Toll-like

Les récepteurs TLR détectent les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) et initient la réponse immunitaire innée en augmentant l'expression de gènes codant des cytokines pro-inflammatoires (Elia *et al.*, 2015) (**Figure 7**). Une augmentation de l'expression du récepteur TLR4 ainsi que deux polymorphismes (D299G et T399I) du gène *TLR4* ont été rapportés dans la MC (Cario and Podolsky, 2000). Cependant, ces polymorphismes ne constitueraient qu'un facteur de risque mineur pour la MC (Cheng *et al.*, 2015b). Une diminution de l'expression du récepteur TLR3 (Cario and Podolsky, 2000) et la présence d'un polymorphisme dans le promoteur du récepteur TLR9 (Török *et al.*, 2004) ont également été observées chez les patients Crohn.

Les récepteurs NOD-like

Le gène *NOD2* (*nucleotide-binding oligomerization domain 2*)/*CARD15* (*caspase activated recruitment domain-15*) codant pour le récepteur NOD2 est le premier gène de susceptibilité associé à la MC mis en évidence (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001). Ce récepteur, principalement exprimé par les cellules de Paneth, les cellules immunitaires et les cellules souches des cryptes intestinales, permet la reconnaissance du muramyl dipeptide (MDP), un composant du peptidoglycane des bactéries à paroi Gram positive et négative, et l'activation des voies de signalisation NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) et MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) régulant la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et des peptides antimicrobiens (Elia *et al.*, 2015). Trois principaux polymorphismes ont été identifiés chez les patients atteints de MC et représentent plus de 80 % des variants associés à la MC rencontrés dans la population caucasienne (Hugot *et al.*, 2007). Ces variants conduisent à la production de protéines NOD2 variantes (R702W, G908R) ou tronquée (L1007fsinsC) augmentant le risque de développer une MC de 1,5 à 3 fois chez les sujets hétérozygotes, et d'environ 40 fois chez les sujets homozygotes pour un allèle à risque ou hétérozygotes composites (deux allèles à risque différents) par rapport à des sujets ne présentant pas ces polymorphismes (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001). Récemment, neuf nouveaux variants dans le gène *NOD2* ont été identifiés chez des patients atteints de MC et pourraient constituer un nouveau facteur de risque (Chen *et al.*, 2018a; Frade-Proud'Hon-Clerc *et al.*, 2019). Les protéines NOD1 et NOD2 sont également impliquées dans l'induction de l'autophagie, un processus détaillé page 45, en recrutant la protéine ATG16L1 (*autophagy-related gene (ATG) 16 like 1*) à la membrane plasmique au point d'entrée de la bactérie et en induisant la formation de l'autophagosome (Travassos *et al.*, 2010). Par ailleurs, certains polymorphismes à risque de *NOD2* entraînent un défaut de production d' α -défensines par les cellules de Paneth (Wehkamp *et al.*, 2004). Chez l'Homme, une augmentation des *Bacteroidetes* et des *E. coli* et une

diminution de *Faecalibacterium prausnitzii* (*Firmicutes*) ont été observées au niveau de la muqueuse iléale des patients atteints de MC et homozygotes pour l'un des variants à risque *NOD2* (Al Nabhani *et al.*, 2017). Cependant, aucune association entre le génotype de *NOD2* et l'altération du microbiote fécal chez des patients Crohn ou des sujets contrôles n'a pu être mise en évidence (Kennedy *et al.*, 2018), la dysbiose entraînée par le polymorphisme de *NOD2* pourrait donc n'être observée qu'au niveau de la muqueuse intestinale et non au niveau fécal.

Les gènes de l'autophagie

D'autres gènes impliqués dans l'autophagie ont été identifiés comme des facteurs de risque de la MC. L'autophagie est un processus des cellules eucaryotes qui permet la dégradation d'éléments cytoplasmiques tels que des organites ou protéines par les lysosomes mais aussi le contrôle de la multiplication des bactéries pathogènes et leur élimination (Galluzzi *et al.*, 2017). Les sujets présentant des SNP au sein de régions codantes pour des gènes de l'autophagie, en particulier *ATG16L1*, *NOD2*, *IRGM* (*immunity-related GTPase family M*), *PTPN2* (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2*), *ULK1* (*Unc-51 like autophagy activating kinase 1*) et *NDP52* (*nuclear dot protein 52*, appelé également *CALCOCO2*, *calcium binding and coiled-coil domain 2*), présentent un risque accru de développer la MC (Larabi *et al.*, 2019). En effet, la présence de ces polymorphismes altère le processus autophagique, qui n'est plus capable de contrôler la multiplication des bactéries pathogènes, résultant en une augmentation de l'inflammation (Larabi *et al.*, 2019). Les différents *loci* de susceptibilité ainsi que leur implication dans la MC seront discutés dans la partie III.5 Autophagie, physiopathologie intestinale et MC.

Les gènes associés à la réponse au stress du RE

Deux polymorphismes dans le gène *XBP1* (*X-box binding protein 1* ; rs5997391 et rs35873774 (intron)), codant pour un facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress du RE et plus particulièrement dans la réponse aux protéines mal repliées, ont été associés à une susceptibilité accrue à développer la MC. Ces SNP conduiraient à la production d'une protéine *XBP1* ayant une activité réduite par rapport à la protéine sauvage, entraînant un dysfonctionnement des cellules de Paneth et augmentant la sensibilité de l'épithélium intestinal aux stimuli inflammatoires (Kaser *et al.*, 2008). L'absence d'*XBP1* a également été associée à une activité autophagique amplifiée compensant le stress du RE (Adolph *et al.*, 2013; Hetz *et al.*, 2009). Cependant, la combinaison de la délétion du gène *Xbp1* et d'un gène de l'autophagie dans les cellules épithéliales intestinales chez des souris entraîne la mise en place d'une iléite transmurale (affectant toutes les couches de la paroi intestinale) sévère et spontanée comme observée dans la MC (Adolph *et al.*, 2013).

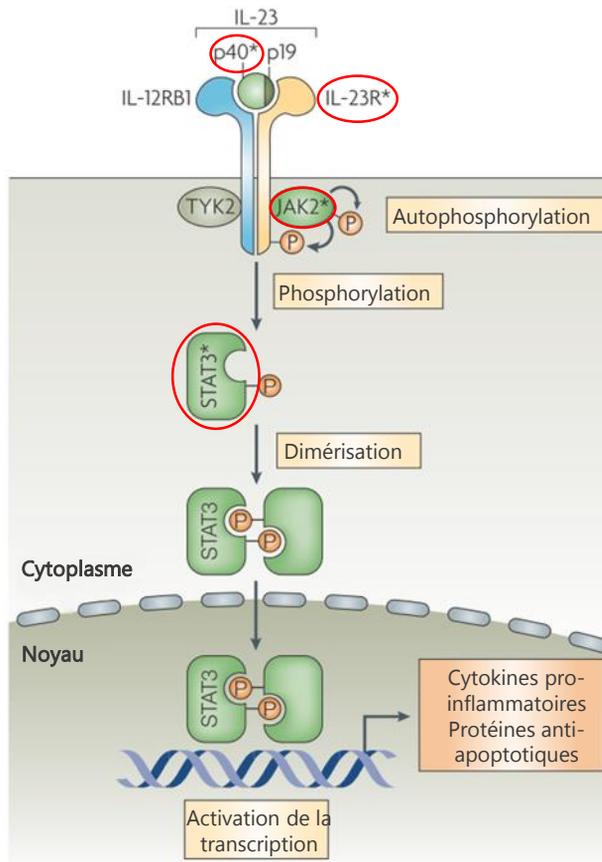


Figure 8 : Signalisation consécutive à l'activation du récepteur IL-23R conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17.

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

I.2.1.2.3 Gènes régulant les réponses immunitaires adaptatives

L'homéostasie intestinale repose sur une balance entre les signaux pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Cependant, un déséquilibre entre les lymphocytes T régulateurs (Treg) sécrétant des cytokines anti-inflammatoires et les lymphocytes Th1 ou Th17 défendant la muqueuse contre les bactéries, champignons et virus en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires, entraîne une sécrétion excessive de cytokines et chimiokines et favorise la mise en place d'une inflammation (Huang and Chen, 2016). Les Th et les Treg dérivent de la même cellule précurseur (**Figure 6B**) (Brand, 2009) et l'identification de SNP au sein de *loci* impliqués dans la différenciation et la fonction des lymphocytes, tels que *SMAD3* (*SMAD family member 3*) jouant un rôle clé dans l'induction des Treg (Lu *et al.*, 2010), *IL2RA* (*IL2 Receptor subunit alpha*) régulant les réponses des Treg face aux auto-antigènes rencontrés (Dendrou *et al.*, 2009), ou encore la cytokine anti-inflammatoire *IL10* ou son récepteur (*IL10R*) impliqués dans les réponses anti-inflammatoires (Glocker *et al.*, 2009) a permis d'associer ce déséquilibre à la MC (Franke *et al.*, 2010).

Le rôle prépondérant de l'axe IL-23/IL-17 dans la MC a été fortement supporté par l'identification de variants dans différents gènes de cette voie. Trois polymorphismes dans le gène *IL23R* (R381Q, G149R et V362I) codant pour une sous-unité du récepteur à l'IL-23 diminuent le risque de développer la MC (Duerr *et al.*, 2006; Rivas *et al.*, 2011). Physiologiquement, la liaison de l'IL-23 à l'IL23R permet l'activation de JAK2 (*Janus kinase 2*) permettant la phosphorylation des facteurs de transcription STAT (*signal transducer and activator of transcription*) 3 et STAT4, conduisant à la transcription de cytokines pro-inflammatoires permettant la différenciation des Th17 pro-inflammatoires (Abraham and Cho, 2009) (**Figure 8**). Les variants du gène *IL23R* entraînent une perte de fonction du récepteur, diminuant par conséquent la production de cytokines pro-inflammatoires et l'activation des Th17 en réponse aux bactéries commensales (Sivanesan *et al.*, 2016). De plus, d'autres SNP dans des gènes impliqués dans l'axe IL-23/IL-17, tels que les gènes codant pour la sous-unité p40, STAT3, JAK2, le récepteur de chimiokine CCR6 (*C-C chemokine receptor type 6*, exprimé par les cellules produisant l'IL-17) (Polgar *et al.*, 2012) ou encore l'IL-17 elle-même (Kim *et al.*, 2011b) ont été associés à un risque plus élevé de développer la MC (**Figure 8**). Les personnes cumulant plusieurs allèles à risque dans les gènes de cette voie présenteraient un risque accru de développer la MC, indiquant des interactions possibles entre ces gènes de susceptibilité (Polgar *et al.*, 2012).

I.2.1.3 Régulation de l'expression des gènes et facteurs épigénétiques

Le fait que la majorité des variants de risque associés à la MC soient situés dans des régions non codantes du génome souligne l'importance des régulation épigénétiques dans la MC (Edwards *et al.*, 2013).

I.2.1.3.1 Interactions de la chromatine

Parmi les 163 SNP identifiés en 2014 comme associés aux MICI, 92 sont situés au niveau d'éléments régulateurs de la transcription actifs (Mokry *et al.*, 2014). De même, les promoteurs et activateurs régulés positivement au niveau du côlon chez les patients atteints de MICI sont fortement enrichis en SNP associés aux MICI et modulent l'expression de gènes impliqués dans les réponses inflammatoires et le maintien de la barrière intestinale (Boyd *et al.*, 2018). Ainsi, les gènes contrôlés par ces éléments régulateurs associés à la MC devraient être eux aussi considérés comme des gènes candidats pouvant augmenter le risque de développer une MICI.

L'étude des interactions en 3 dimensions de la chromatine par une technique appelée 4C-seq (*chromosome conformation capture-on-chip-sequencing*) permet d'identifier des interactions physiques inter- ou intra-chromosomiques entre les gènes et leurs éléments régulateurs (Gheldof *et al.*, 2012). Une étude 4C-seq menée sur différents types cellulaires a identifié 902 nouveaux gènes candidats interagissant avec 92 éléments régulateurs de l'ADN situés dans des *loci* de susceptibilité associés aux MICI (Meddens *et al.*, 2016). Une autre étude réalisée sur les tissus du côlon de patients atteints de MC ou de sujets non atteints de MICI a révélé l'existence de 2 sous-types de MC cliniquement pertinents basés sur l'accessibilité de leur chromatine et leur profil d'expression génique (Weiser *et al.*, 2018). De plus, les éléments activateurs potentiels généralement actifs au niveau de l'iléon chez les sujets contrôles sont accessibles et actifs au niveau du côlon chez les patients Crohn et leur activité a été corrélée avec un profil d'expression génique similaire à un profil iléal et associée aux différents phénotypes cliniques de la MC (Weiser *et al.*, 2018).

I.2.1.3.2 Méthylation de l'ADN

Plusieurs études épigénétiques à l'échelle du génome (EWAS, *epigenome-wide methylation association studies*) ont montré une différence du niveau de méthylation dans des gènes associés à la MC (Cooke *et al.*, 2012; Nimmo *et al.*, 2012; Ventham *et al.*, 2016). La comparaison des profils de méthylation de lymphocytes B de patients atteints de MC et celui de leur frère/sœur sain(e) a mis en évidence la méthylation de 14 sites CpG associés à la MC (Lin *et al.*, 2012b). Une altération de la méthylation de l'ADN des leucocytes du sang périphérique de patients atteints de la MC a également été rapportée dans les gènes *MIR (microRNA)21*, *TXK* (tyrosine kinase), *ITGB2 (integrin subunit beta 2)* et les *loci HLA (human leukocyte antigen)* des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH), comparativement à des sujets contrôles (Ventham *et al.*, 2016). Enfin, l'analyse de la méthylation de l'ADN des cellules T effectrices et mémoire de la *lamina propria* a montré une association entre l'état de méthylation d'un SNP (rs36221701) situé près du gène *SMAD3* et son niveau d'expression (Chiba *et al.*, 2018). De manière plus globale, une hyperméthylation de l'ADN du sang périphérique a récemment été rapportée chez des patients

atteints de MC en phase active mais pas chez les patients en phase inactive de la maladie, comparativement à des sujets contrôles, suggérant que les modifications des marques épigénétiques résulteraient de la présence de l'inflammation plutôt que du développement ou de la progression de la MC (Somineni *et al.*, 2019). Cependant, une autre étude menée sur cellules épithéliales de l'iléon terminal et du côlon de patients atteints de MC suggère que le changement de méthylation de l'ADN associé à une modification du profil transcriptomique observé chez ces patients comparativement à des sujets contrôles serait partiellement indépendant du statut inflammatoire (Howell *et al.*, 2018). Ainsi, de nouvelles études sont nécessaires afin de déterminer si ces changements sont une cause ou une conséquence de la MC.

I.2.1.3.3 Modifications des histones

Une augmentation de l'acétylation des histones H3 et H4 a été rapportée au niveau de la muqueuse inflammée du côlon comparativement à la muqueuse non inflammée dans un modèle de colite induite chez le rat par un traitement à l'acide sulfonique 2,4-trinitrobenzène (TNBS) (Tsaprouni *et al.*, 2011). De même, l'acétylation des histones H4 est augmentée au niveau des tissus inflammés et des plaques de Peyer comparativement aux zones non inflammées dans un modèle de colite induite au DSS chez le rat ainsi que chez des patients atteints de MC (Tsaprouni *et al.*, 2011). Paradoxalement, l'administration d'inhibiteurs d'histones déacétylases (HDAC) à des modèles animaux de colite expérimentale induite au TNBS diminue la sévérité de la maladie et l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Glauben *et al.*, 2006). De plus, l'inhibition de l'HDAC9, jouant un rôle pro-inflammatoire en modèle murin de MICI, favorise le développement des lymphocytes T régulateurs, prévenant ainsi l'apparition d'une colite induite au DSS ou par un transfert adoptif de cellules T chez la souris (de Zoeten *et al.*, 2010).

I.2.1.4 Transcriptome et MICI

Plusieurs études portant sur la dérégulation du transcriptome ont été menées chez les patients atteints de MICI et ont permis d'identifier une expression aberrante des ARNm, des microARN (miARN, miR) et de longs ARN non codants (lncRNAs, *long non-coding RNAs*) ainsi qu'une dérégulation de nombreux mécanismes moléculaires directement impliqués dans les MICI.

I.2.1.4.1 Les ARN messagers

L'analyse du niveau des ARNm de biopsies coliques de patients atteints de MICI comparativement aux sujets contrôles a rapporté une dérégulation de l'expression de 50 gènes impliqués dans la gestion du rythme circadien (Palmieri *et al.*, 2015) jouant un rôle dans l'étiologie de la MC *via* son impact sur l'inflammation et le microbiote intestinal (Sobolewska-Włodarczyk *et*

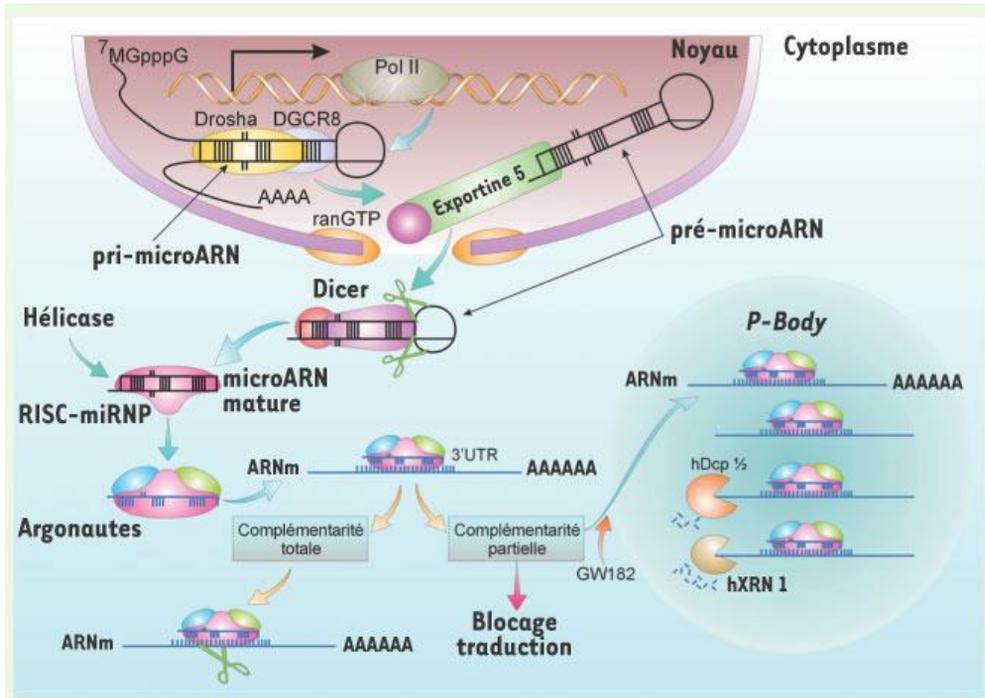


Figure 9 : Biogenèse et maturation des microARNs.

Les gènes des microARNs (miARNs) sont transcrits par une ARN polymérase II (Pol II) dans le noyau pour former des intermédiaires de biosynthèse de grande taille, les pri-miARN, qui sont majoritairement capés (7^{M}GpppG) et polyadénylés (AAAA) et contiennent une ou plusieurs structures en épingle à cheveux. Les pri-miARN sont ensuite modifiés par une RNase III, Drosha en association avec son co-facteur DGCR8 pour former des produits d'environ 70 nucléotides, les pré-miARN. L'exportine 5 et Ran-GTP permettent la translocation du pré-miARN dans le cytosol. Celui-ci est clivé par une seconde RNase III, Dicer, engendrant un duplex d'environ 20 nucléotides. Le miARN mature est alors transféré au complexe multiprotéique RISC-miRNP. Une hélicase facilite la séparation du double brin du duplex et l'association de protéines Argonautes stabilise le brin monocaténaire du miARN au sein de RISC-miRNP. Le miARN mature contrôle négativement l'expression protéique et la stabilité de sa cible en se fixant sur une séquence complémentaire de la partie 3'-UTR de l'ARNm cible au niveau des polysomes. Le degré de complémentarité détermine le devenir de l'ARNm. Si cette complémentarité est totale, le miARN entraîne la dégradation de l'ARNm (coupure endonucléolytique) par Argonaute 2, alors qu'une complémentarité partielle inhibe l'initiation et/ou l'élongation de la traduction et peut aboutir à la dégradation exonucléolytique de l'ARNm dans des compartiments cytosoliques dynamiques, les *P-bodies* ou *GW-bodies*. Ces structures contiennent une forte concentration de molécules impliquées dans la dégradation des ARNm (désadénylase, *Decapping complex* hDcp1/2 et 5'-3' exonucléase hXRN1). Le ciblage des duplexes miARN/ARNm dans les *P-bodies* ferait intervenir un composant structural des *P-bodies*, la protéine GW182. DGCR8, *DiGeorge syndrome critical region gene 8* ; RISC-miRNP, *RNA-induced silencing complex-micro-ribonucleoprotein* (d'après Ogier-Denis *et al.*, 2007).

al., 2016). De plus, une dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans la régulation de l'inflammation, tels que les récepteurs aux interleukines ou les interleukines elles-mêmes, ainsi que des variations dans l'épissage des ARNm a été mise en évidence dans les biopsies de sujets atteints de MICI comparativement aux sujets contrôles et a été corrélée à une altération des taxa bactériens adhérents à la muqueuse, suggérant que l'interaction entre le microbiote et le transcriptome de l'hôte est dramatiquement perturbé chez les patients atteints de MICI (Häsler *et al.*, 2017). Enfin, une expression différentielle de 19 gènes a été observée entre les muqueuses inflammées et non inflammées chez les patients atteints de MC. L'expression différentielle majeure concerne le gène *CXCL1* (*C-X-C Motif Chemokine Ligand 1*) surexprimé au niveau de la muqueuse inflammée et impliqué dans l'infiltration et l'accumulation des leucocytes dans les tissus inflammés (Hong *et al.*, 2017).

I.2.1.4.2 Les ARN non codants

Les microARN régulateurs : biogenèse et mode d'action

Les microARN (miARN, miR) sont des ARN non codants de 21 à 23 nucléotides de long régulant l'expression de gènes au niveau post-transcriptionnel de deux manières principales : soit en interagissant avec la région 3'-UTR (*untranslated region*) des ARN messagers cibles pour réguler négativement leur traduction, soit par un mécanisme de clivage de l'ARNm cible (**Figure 9**) (O'Brien *et al.*, 2018). Plus rarement, les miARN peuvent se fixer au niveau des régions 5'UTR ou des séquences codantes de leurs cibles mais aussi permettre non pas une inhibition, mais une activation de la transcription (Ni and Leng, 2015).

MicroARN et pathogenèse de la maladie de Crohn

Une dérégulation des miARN a été mise en évidence dans la muqueuse du côlon et de l'iléon de patients atteints de MC active comparativement aux sujets sains ainsi que dans la muqueuse inflammée ou non inflammée des patients atteints de MC comparativement aux sujets contrôles ou aux patients atteints de RCH. De plus, une dérégulation des miARN a été observée entre les zones inflammées et les zones non inflammées chez les patients atteints de MC (**Tableau 1**). Certains de ces miARN modulent des voies biologiques impliquées dans la MC.

La dérégulation des miARN pourrait avoir un impact sur la fonction barrière de l'épithélium. Le miR-223, surexprimé dans le tissu intestinal en modèle murin traité au TNBS et régulé par la voie IL-23, inhibe l'expression de la CLDN8 tandis que son inhibition par administration d'un miARN antisens améliore le score histologique et diminue la sévérité de la colite induite au TNBS (Wang *et al.*, 2016a). Chez les patients atteints de MC, ce miARN est également surexprimé au niveau de la muqueuse colique tandis que la quantité de CLDN8 est

Tableau 1 : Bilan des miARN dérégulés entre les tissus inflammés et les tissus non inflammés chez les patients atteints de MC.

En **gras**, les miARN surexprimés.

miARN dérégulés	Type d'échantillons	Population (n)	Techniques utilisées	Références
let-7a-2-3p, miR-199b-5p, 204-3p, 205-3p, 2116-5p, 3189-3p, 3202, 361-3p, 3976, 4290, 4308, 4445-5p, 4449, 4455, 4484, 4531, 4533, 4644, 4698, 4709-3p, 483-3p, 485-3p, 5002-5p, 5187-3p, 5196-3p, 519e-3p, 630, 877-3p, let-7g-5p, miR-101-3p, 103a-3p, 1260b, 140-3p, 141-3p, 145-5p, 192-5p, 200c-3p, 21-5p, 223-3p, 22-3p, 23b-3p, 24-3p, 29a-3p, 30c-5p, 3676-5p, 4284, 4286, 4328, 4454, 4500, 4524b-5p, 4532, 5100, 5701, 767-5p	Iléon	MC active, muqueuse inflammée (n = 6) vs sujets contrôles (n = 6)	Microarray	Guo <i>et al.</i> , 2015
hsa-let-7a-2-3p, miR-204-3p, 205-3p, 3152-5p, 4290, 4308, 4324, 4445-5p, 4455, 4484, 4531, 4644, 4709-3p, 485-5p, 5002-5p, 5187-3p, 519e-3p, 630, hsa-let-7b-5p, miR-103a-3p, 1260b, 141-3p, 142-3p, 145-5p, 191-5p, 192-5p, 199a-5p, 200b-3p, 200c-3p, 21-5p, 23b-3p, 24-3p, 30c-5p, 31-5p, 320b, 3676-5p, 371b-5p, 4284, 4454, 4500, 4532, 5100, 5701, 767-5p	Iléon	MC active, muqueuse non inflammée (n = 6) vs sujets contrôles (n = 6)	Microarray	Guo <i>et al.</i> , 2015
miR-1273d, 1273g-3p, 199b-5p, 361-3p, 4292, 4687-5p, 622, 941, 124-3p, 4311, 564, 628-3p, 874	Iléon	MC active, muqueuse inflammée (n = 6) vs muqueuse non inflammée (n = 6)	Microarray	Guo <i>et al.</i> , 2015
miR-146a, 155	Duodénum	Muqueuse inflammée (n = 10) vs muqueuse non inflammée (n = 10) de patients MC et sujets contrôles (n = 10)	Microarray et qRT-PCR	Szücs <i>et al.</i> , 2016
miRPlus-F1195, miR-150, miRPlus-E1186, E1049, miR-508-5p, 3176, 223, 215, 2116*, 125b, 1205, 10a, 563, 429, 378/378c, 3176, 23a, 222, 196b, 143*	Côlon ascendant non inflammé	MC muqueuse non inflammée (n = 7) vs sujets contrôles (n = 7)	Microarray	Wu <i>et al.</i> , 2017
miRPlus-F1104, E 1225, E1194, E1133, E1093, E1016, A1087, miR-551b, 451, 374a, 342-3p, 33a, 338-3p, 32, 31*, 31, 30e, 30e*, 29b, 26b, 223, 21, 20a, 19a, 199a-3p/199b-3p, 195, 183*, 17, 16, 15b, 15a, 146b-5p, 144, 142-5p, 142-3p, 126*, 126, 1259, 101, 7i, 7g, 7f, 7a, miRPlus-F1094, F1035, F1019, E1196, E1186, E1172, E1112, E1067, E1056, E1049, E1042, E1028, E1012, C1110, miR-937, 595, 548m, 5481, 542-5p, 524-3p, 508-5p, 491-3p, 378/378c, 330-3p, 2116*, 1973, 196b, 147b, 147, 1287, 122, 1205, 106b-, let7d*	Côlon ascendant inflammé	MC muqueuse inflammée (n = 7) vs sujets contrôles (n = 7)	Microarray	Wu <i>et al.</i> , 2017
miRPlus-F1104, E1133, A1087, miR-98, 9*, 451, 424, 374b, 374a, 342-3p, 33a, 338-3p, 335, 32, 31, 31*, 30e, 30e*, 30b, 30a, 301a, 29b, 27b, 27a, 26b, 26a, 25, 24, 23b, 223, 222, 221, 215, 21, 20a, 19b, 199a-3p/199b-3p, 195, 194, 193-3p, 192, 190, 18a, 181d, 181a, 17, 16, 15b, 15a, 151-5p, 148a, 146b-5p, 144, 142-5p, 142-3p, 140-5p, 130a, 126*, 126, 125b, 1259, 122*, 10a, 106b, 106a, 101, 1, let-7i, let-7g, let-7f, let-7d, let-7a, miRPlus-F1195, E1232, E1212, E1200, E1196, E1193, E1191, E1189, E1175, E1153, E1112, E1042, E1028, E1012, miR-888*, 574-5p, 5481, 519e, 491-3p, 32*, 205*, 1973, 195*, 1304, 1255a, 1246, 106b*	Côlon ascendant	MC muqueuse inflammée (n = 7) vs MC muqueuse non inflammée (n = 7)	Microarray	Wu <i>et al.</i> , 2017
miR-193B, 19A, let-7I, 1273D, 886-5P, 668, 720, 455-3P, 3138, 612, 551B, 4264, let-7I*, 24, 3194, 196A, 192, 200A, 192*, 1913, 378B, 323B-3P, 3150, 422A, 611, 3184, 4284, 129*	Côlon	Muqueuse inflammée (n = 15) vs muqueuse non inflammée (n = 15) de patients MC	Microarray	Palmieri <i>et al.</i> , 2017
miR-144, 211, 519 et 373-3p	Côlon	Muqueuse inflammée (n = 17) vs muqueuse non inflammée (n = 18) de patients MC	qRT-PCR	Rojas-Feria <i>et al.</i> , 2018

diminuée (Wang *et al.*, 2016a). Le miR-15a, augmenté chez les patients atteints de MC, régule négativement l'expression de la GTPase *CDC42* (*Cell Division Cycle 42*) nécessaire à la différenciation des cellules souches épithéliales intestinales et à la formation d'une barrière épithéliale intestinale fonctionnelle (Tang *et al.*, 2018). Enfin, une diminution de l'expression du miR-29b pourrait favoriser le développement de la fibrose de l'épithélium intestinal, un facteur majeur du développement de la MC, en augmentant l'expression du collagène dans les fibroblastes chez les patients atteints de MC (Nijhuis *et al.*, 2014).

Plusieurs miARN participent à la pathogenèse de la MC en agissant sur l'immunité innée. Les miR-192, miR-495, miR-512 et miR-671 suppriment l'expression de *NOD2*, l'activation de NF- κ B médiée par le MDP et l'expression de l'ARNm codant pour l'IL-8 dans les cellules épithéliales du côlon (Chuang *et al.*, 2014). Le miR-320 et miR-10a, ciblant *NOD2* sont sous-exprimés dans les biopsies intestinales inflammées de patients pédiatriques atteints de MC et leurs niveaux sont inversement corrélés au niveau d'expression de *NOD2* (Pierdomenico *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2015b). En modèle murin de colite induite au DSS, la stimulation de *NOD2* permet la production d'oxyde nitrique induisant l'expression du miR-146a ciblant l'ARNm codant la protéine NUMB, activant la voie Sonic Hedgehog et amplifiant les réponses pro-inflammatoires (Ghorpade *et al.*, 2013). De plus, la reconnaissance du microbiote par les TLR des cellules dendritiques et des macrophages diminue l'expression du miR-107 réprimant *IL23p19*, conduisant à la production d'IL-23 (Xue *et al.*, 2014). Par ailleurs, le miR-590-5p, significativement diminué dans les biopsies coliques de patients atteints de MC et dans le côlon de souris traitées au TNBS comparativement aux sujets et animaux contrôles, cible l'ARNm *YAP* (*yes-associated protein*) codant pour la protéine YAP impliquée dans la voie Hippo participant à la régénération intestinale. Cette protéine est fortement associée à l'inflammation intestinale et est augmentée dans le tissu intestinal des patients atteints de MC (Yu *et al.*, 2018). L'inhibition de l'axe miR-590-5p/YAP chez les souris diminue l'intensité de la colite expérimentale (Yu *et al.*, 2018). Enfin, le miR-31, augmenté dans la muqueuse inflammée des patients atteints de MC et de modèles murins de colite induite chimiquement, diminue l'inflammation au niveau du côlon en limitant l'expression des ARNm codant les récepteurs de cytokines *IL17R* et *IL17RA* et les protéines de signalisation *IL6ST* (*IL6 signal transducer*) et régule les voies de signalisation WNT et Hippo afin de favoriser la régénération de l'épithélium intestinal (Tian *et al.*, 2019).

Les miARN peuvent avoir un impact sur les cellules de l'immunité adaptative, et notamment sur les cellules T (Xu and Zhang, 2016). En effet, une mutation en 3'-UTR de l'ARNm *IL23R* et associée à la MC entraîne la perte de la fixation des microARN Let-7e et Let-7f, expliquant ainsi l'expression augmentée de ce gène chez les patients atteints de MC (Zwiers *et al.*, 2012). Le miR-10a, diminué dans la muqueuse inflammée et les monocytes du sang périphérique des patients

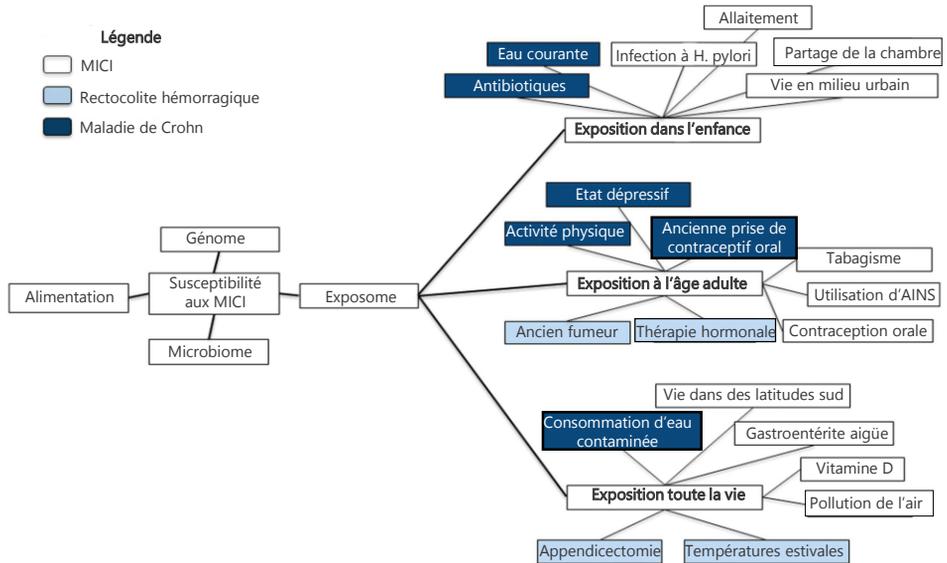
atteints de MC mais augmenté suite à un traitement aux anti-TNF, supprime les réponses Th1 et Th17 (Wu *et al.*, 2015b). De même, le miR-106a, ciblant l'ARNm *IL10*, est augmenté en réponse au TNF- α , dans le sérum des patients atteints de MC chez lesquels son niveau est corrélé à la sévérité de la maladie, mais également en modèle murin de MC (Sanctuary *et al.*, 2019). *In vitro*, l'inhibition sélective du miR-106a favorise l'activité des Treg tandis qu'en modèles murins de MICI, la perte de ce miARN supprime l'expansion des Th1 et des Th17 et atténue l'iléite chronique (Sanctuary *et al.*, 2019). Le miR-155, surexprimé au niveau du côlon des patients atteints de MC, pourrait influencer la différenciation des Th1 et Th17 comme observé en modèle murin de colite (Liu *et al.*, 2018d; Singh *et al.*, 2014) et participerait au développement des cellules Treg (Kohlhaas *et al.*, 2009).

Enfin, les miARN peuvent moduler l'autophagie et donc influencer la MC, un sujet développé dans la partie III de ce manuscrit.

Les lncRNAs et la maladie de Crohn

Les lncRNAs sont des molécules d'ARN de plus de 200 nucléotides régulant l'expression des gènes au niveau transcriptionnel, post transcriptionnel et épigénétique (Zacharopoulou *et al.*, 2017). Une étude menée sur les lncRNAs associés à la MC par les GWAS et annotés dans les bases de données existantes a permis d'identifier 1131 séquences codant des lncRNAs à proximité de gènes associés aux MICI ainsi que 2063 SNP dans 468 gènes codant des lncRNAs associés aux MICI (Mirza *et al.*, 2014). Une étude transcriptomique a mis en évidence une dérégulation de 1988 lncRNAs dans le plasma de patients atteints de MC (Chen *et al.*, 2016). Une étude a rapporté 438 lncRNAs, dont 100 spécifiques à la MC, comme dérégulés dans la muqueuse inflammée de patients atteints de MICI (Mirza *et al.*, 2015) tandis qu'une seconde étude a montré la dérégulation de 459 lncRNA au niveau iléal chez des patients pédiatriques nouvellement diagnostiqués comme atteints de MC (Haberman *et al.*, 2018) comparativement aux sujets contrôles. Enfin, 8 lncRNAs ont été retrouvés comme différentiellement exprimés entre la muqueuse iléale saine et la muqueuse iléale lésée chez les patients atteints de MC (Li and Shi, 2019). L'analyse *in silico* des ARNm ainsi que des miARN régulateurs et facteurs de transcription étroitement liés à ces lncRNAs montre que ces lncRNAs seraient impliqués, entre autres, dans l'activation de l'inflammation et la différenciation des Th17 (Li and Shi, 2019). Enfin, la diminution de l'expression du lncRNA ANRIL (*antisense noncoding RNA in the INK4 locus*) dans la muqueuse intestinale a été corrélée à l'augmentation du risque de développer la MC, à une plus forte activité de la MC et à un niveau élevé de cytokines pro-inflammatoires, tandis qu'une augmentation de ce lncRNA est observée chez les patients répondeurs au traitement par l'infliximab (Ge *et al.*, 2019). En terme de mécanismes moléculaires, une des seules associations entre lncRNAs et physiopathologie de la MC montre que l'augmentation

A



B

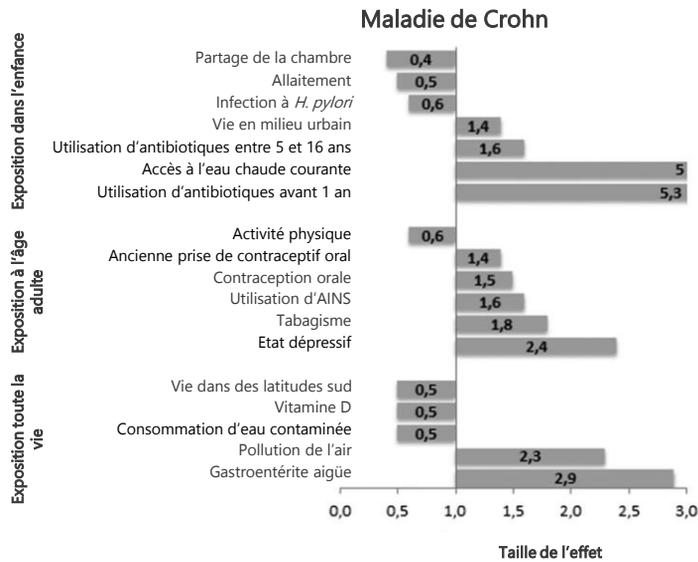


Figure 10 : Vue d'ensemble des facteurs environnementaux impliqués dans les MICI.

De nombreux facteurs environnementaux, constituant l'exposome d'un individu, peuvent s'avérer protecteur ou au contraire augmenter le risque de développer une MICI. **A.** les facteurs peuvent être communs ou varier selon le type de MICI. **B.** La taille des effets est exprimée selon leur *odds ratio* ou leur *hazard ratio*, en fonction des publications sources (modifiée d'après van der Sloot *et al.*, 2017).

du niveau du lncRNA DQ786243 pourrait réguler l'expression de *CREB1* (*CAMP responsive element binding protein 1*) et *FOXP3* (*forkhead box P3*) et donc moduler la fonction des Treg dans les cellules mononucléaires du sang périphérique de patients atteints de MC active comparativement à des patients atteints de MC inactive ou aux sujets contrôles (Qiao *et al.*, 2013).

I.2.2 Facteurs environnementaux

L'importance des facteurs environnementaux dans l'étiologie de la MC est étayée par différents arguments : (i) un taux de jumeaux monozygotes où les 2 individus sont atteints de 20 à 50 % seulement (Halfvarson *et al.*, 2003; Orholm *et al.*, 2000), (ii) une répartition très hétérogène de la MC dans le monde avec une augmentation importante de l'incidence dans les pays industrialisés au cours de la deuxième partie du 20^{ème} siècle et plus récemment dans les pays en voie de développement associée à un changement rapide du mode de vie dans ces pays (Ng *et al.*, 2017), (iii) des différences d'incidence dans certaines populations migrantes, avec par exemple une augmentation du nombre de MICI chez les populations asiatiques migrant en Europe et, à l'inverse, une diminution du risque de MICI chez les populations européennes migrant en Asie (Ko, 2014). On parle d'« exposome » pour désigner l'ensemble des facteurs environnementaux auxquels un individu est exposé dès la période néonatale puis tout au long de sa vie et qui peuvent influencer le développement de la MC (**Figure 10**) (Wild, 2005).

I.2.2.1 Facteurs de risque

I.2.2.1.1 Tabagisme

Le tabagisme est probablement le facteur de risque environnemental associé à la MC le mieux établi, même si son mécanisme d'action n'est pas totalement compris (Underner *et al.*, 2016). Le tabagisme multiplie environ par deux le risque de développer une MC par rapport aux non-fumeurs et augmente de manière dose-dépendante le risque de poussées, d'hospitalisation, de complications, de recours aux corticoïdes et à la chirurgie ainsi que la récurrence post-opératoire chez les patients Crohn (Underner *et al.*, 2016). De même, le fait d'avoir été exposé *in utero* au tabac augmente le risque de complication et le risque d'hospitalisation des individus atteints de la MC (Lindoso *et al.*, 2018). Même s'ils restent largement débattus, les effets du tabac sur l'évolution de la MC seraient liés à son action sur la muco-sécrétion, la perméabilité intestinale, la production de cytokines pro-inflammatoires, la fonction des macrophages, la microvascularisation (Cosnes, 2004) et l'établissement d'une dysbiose (Benjamin *et al.*, 2012). De plus, le tabagisme peut interagir avec le variant de risque ATG16L1^{T300A} associé à la MC, un SNP causant une substitution de la thréonine en alanine à la position 300 (*T300A*) dans la protéine ATG16L1 correspondante, induisant une

altération de plusieurs voies métaboliques dans les cellules de Paneth, à la fois chez l'Homme et en modèles murins exposés à la fumée de tabac (Liu *et al.*, 2018c).

I.2.2.1.1 Régime, additifs alimentaires et polluants environnementaux

Le régime alimentaire pourrait être un des principaux facteurs environnementaux impliqués dans la survenue de la MC et pourrait expliquer la différence significative d'incidence de cette maladie entre les différentes régions du monde ainsi que l'augmentation de cette incidence chez les populations migrantes. Ainsi, l'alimentation de type occidentale, c'est-à-dire riche en graisses, en acides gras polyinsaturés de type oméga 6, en protéines animales et en sucres favoriserait la survenue de la MC (Chiba, 2019).

Des additifs ou contaminants alimentaires tels que les microparticules, les traces de détergents, les carraghénanes, le polysorbate-80 ou encore le carboxyméthylcellulose pourraient favoriser la diminution de l'épaisseur de la couche de mucus permettant la colonisation de la muqueuse intestinale par des bactéries et induire une inflammation chronique (Chassaing *et al.*, 2015a; Swidsinski *et al.*, 2009). De même, les sucres artificiels induiraient une dérégulation de la défense antimicrobienne et la mise en place d'une dysbiose pouvant favoriser ou exacerber l'inflammation intestinale chez un individu génétiquement prédisposé (Nickerson *et al.*, 2014) (Rodriguez-Palacios *et al.*, 2018). Les nanoparticules de dioxyde de titane, le fer et l'aluminium aggraverait également l'inflammation intestinale en modèle murin de colite (Chua *et al.*, 2013; Pineton de Chambrun *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2017).

Parmi les différents polluants répertoriés, les hydrocarbures aromatiques polycycliques font l'objet d'une surveillance accrue en raison de leur large distribution et de leur forte toxicité pour les humains. L'exposition orale au benzo[a]pyrène altère la composition et l'abondance du microbiote intestinal et conduit à une inflammation modérée de la muqueuse iléale et colique (Rivière *et al.*, 2016). L'exposition à de fortes concentrations de dioxyde d'azote (NO₂) avant l'âge de 23 ans augmente de 2,3 fois le risque de développer la MC (Kaplan *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'inhalation de particules polluantes recueillies en milieu urbain induit un stress oxydant systémique entraînant une augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires au niveau des poumons et du côlon en modèle murin (Vignal *et al.*, 2017).

I.2.2.1.1 Traitements médicamenteux et chirurgical

L'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (Ananthakrishnan *et al.*, 2012), d'aspirine (Chan *et al.*, 2011), de contraceptif oral ou d'un traitement de la ménopause par hormonothérapie (Khalili, 2016) augmente le risque de développer la MC. Une exposition précoce à un traitement antibiotique a été associée à un risque accru de développer une MC infantile de

manière dose dépendante (Kronman *et al.*, 2012; Shaw *et al.*, 2010). En effet, le recours à un traitement antibiotique dans l'enfance et plus particulièrement lors de la première année de vie peut altérer la formation et la composition du microbiote intestinal se développant à cette période (Kronman *et al.*, 2012; Shaw *et al.*, 2010). Ces changements pourraient faciliter la colonisation par des bactéries pathogènes et altérer le processus de tolérance immune, crucial pour le développement du système immunitaire muqueux, entraînant des effets à long terme et augmentant le risque de développer la MC chez des individus génétiquement prédisposés (Petersen and Round, 2014). Comme démontré récemment en modèle murin, l'administration d'antibiotiques pourrait potentialiser l'infection et l'expansion des bactéries *Escherichia coli* adhérentes et invasives (AIEC, *adherent-invasive E. coli*) associées à la MC, ainsi qu'aggraver une infection déjà présente chez l'hôte (Oberc *et al.*, 2019). De plus, une étude menée chez des souris *il-10^{-/-}* a montré que l'administration d'antibiotiques à la mère durant la période périnatale favorise l'établissement d'une dysbiose persistante, un déséquilibre de l'immunité et le développement de la colite chez sa descendance (Miyoshi *et al.*, 2017). La résilience du microbiote et la susceptibilité à développer une colite suite à l'exposition à un antibiotique serait également influencée par le génotype de l'hôte (Goethel *et al.*, 2019). Enfin, une méta-analyse a montré une augmentation du risque de développer une MC dans la première année suivant une appendicectomie tandis que le risque de développer cette pathologie n'est plus augmenté 5 ans plus tard (Kaplan *et al.*, 2008).

I.2.2.1.2 Hypothèse hygiéniste

Différentes études suggèrent un rôle de l'hypothèse hygiéniste dans l'incidence de la MC. Cette hypothèse proposée dans les années 1990 est basée sur la constatation que l'incidence croissante des MICI dans les pays industrialisés ou en voie de développement coïncide avec l'amélioration de l'hygiène au cours du 20^{ème} siècle et la diminution de l'incidence des maladies infectieuses (Bach, 2002). Les études épidémiologiques ont montré que l'incidence des MICI est plus faible dans les populations exposées à de forts taux d'infections intestinales dans l'enfance (Koloski *et al.*, 2008). Le contact avec des animaux, indicateur d'une hygiène plus faible, diminuerait également le risque de développer une MICI (Cholapranee and Ananthakrishnan, 2016). L'importance des événements infectieux dans l'enfance a permis l'évolution de cette hypothèse qui propose maintenant que les personnes vivant dans un environnement évolué seraient protégées des infections infantiles mais seraient susceptibles de développer des infections inflammatoires chroniques à l'âge adulte en réponse à des agents infectieux (Scudellari, 2017).

I.2.2.1.3 Gradient Nord-Sud

Un gradient Nord-Sud est décrit dans la MC (Ng *et al.*, 2017). En Amérique du Nord, les plus fortes incidences sont observées au Canada et au nord des Etats-Unis comparativement au sud du continent (Sonnenberg, 2009). L'incidence moyenne est également plus élevée au nord de l'Europe qu'au sud (6,3 cas contre 3,6 cas pour 100 000 habitants) (Burisch *et al.*, 2013). Une relation inverse pourrait exister en miroir dans l'hémisphère sud où l'incidence la plus élevée a été rapportée en Nouvelle-Zélande (Gearry *et al.*, 2006). Une carence en vitamine D, synthétisée par l'organisme suite à une stimulation par les rayons UV du soleil, est également associée à un risque accru de développer une MC tandis qu'une exposition plus importante aux rayons UV réduit le risque de chirurgie chez les patients atteints de MC (Govani *et al.*, 2015). Le gradient Nord-Sud de l'incidence de la MC pourrait donc s'expliquer en partie par une exposition amoindrie aux UV dans les pays du nord de l'Europe par rapport à ceux du sud (Burisch *et al.*, 2013). Toutefois, ce gradient ne représente qu'une tendance puisqu'une incidence élevée est observée dans le nord de l'Espagne malgré une exposition importante aux rayons UV (Argüelles-Arias *et al.*, 2017).

I.2.2.2 Facteurs protecteurs

I.2.2.2.1 Allaitement

L'allaitement est un facteur protecteur qui diminue d'environ deux fois le risque pour l'enfant de développer la MC (Barclay *et al.*, 2009). Ceci est probablement dû à l'induction d'une tolérance immune à certains antigènes alimentaire et microbiens, le transfert d'anticorps de la mère à l'enfant *via* le lait ainsi que le changement du microbiote intestinal (Parigi *et al.*, 2015).

I.2.2.2.2 Activité physique

La pratique d'une activité physique aurait un rôle protecteur contre la MC. En effet, chez des souris génétiquement prédisposées à développer une MC nourries avec un régime riche en graisses, la pratique d'une activité physique spontanée favorise le maintien d'une normobiose du microbiote intestinal et l'augmentation de l'expression des protéines de jonctions serrées ainsi que du niveau d'acides gras à chaînes courtes après infection par les bactéries AIEC comparativement à des souris sédentaires (Maillard *et al.*, 2019).

I.2.2.2.3 Alimentation

La consommation de fruits, de légumes et de fibres a été associée à un risque plus faible de développer une MC de manière dose dépendante (Hou *et al.*, 2011). La consommation de poissons a également été négativement associée au développement d'une MC iléale ou colique (Maconi *et al.*, 2010). Enfin, un changement de régime alimentaire pourrait avoir un effet bénéfique sur le

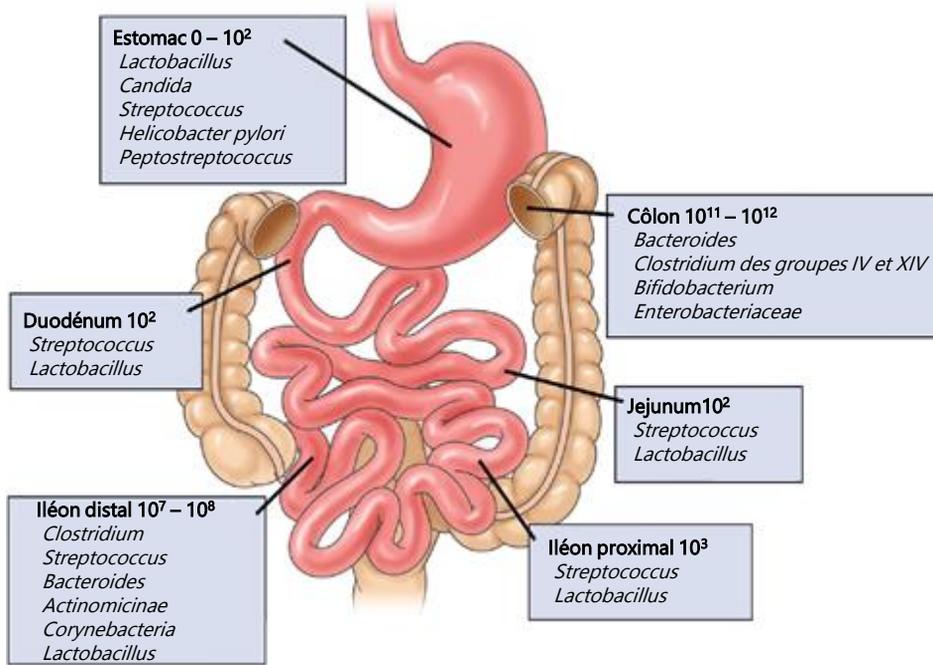


Figure 11 : Diversité et densité des espèces microbiennes dominantes dans les différentes régions du tractus gastro-intestinal.

Les valeurs correspondent aux UFC/g de contenu luminal (modifiée d'après Sartor, 2008).

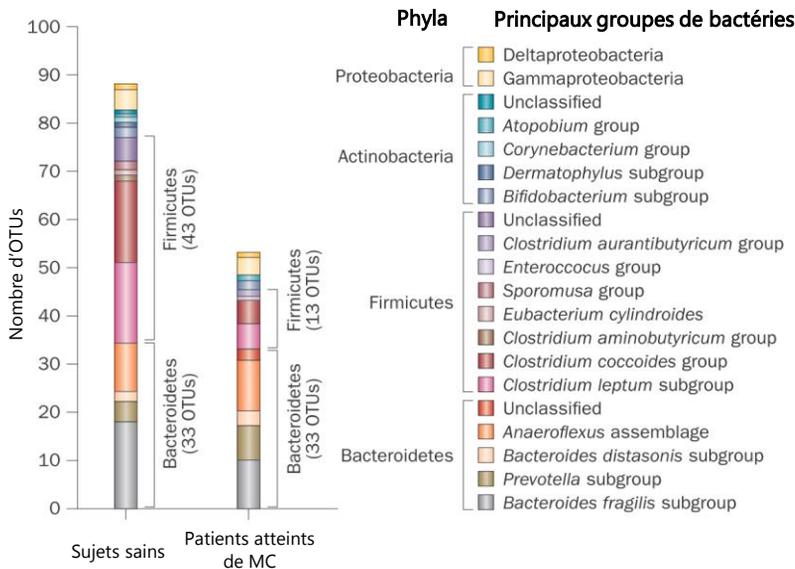


Figure 12 : Réduction de la diversité du microbiote intestinal chez des patients atteints de MC.

La diversité du microbiote intestinal est diminuée chez les patients atteints de MC par rapport à des individus sains. Il s'agit essentiellement d'une réduction de la complexité du phylum des Firmicutes (modifiée d'après Manichanh *et al.*, 2012).

traitement d'une MC déjà installée. Bien que l'utilisation d'un régime alimentaire spécifique dans le traitement de cette pathologie n'ait été testé que sur des cohortes réduites, les résultats semblent encourageants (Limketkai *et al.*, 2019). Ces régimes reposent sur l'élimination ou la diminution significative d'un ou plusieurs groupes d'aliments, tels que les glucides complexes, l'amidon, les céréales, la viande rouge ou encore les produits laitiers et sur la consommation de légumes spécifiques, de yaourt maison et de certains haricots. Cependant, les effectifs réduits et le faible nombre d'études axées ne permettent pas encore de conclure sur l'intérêt de ces régimes (Limketkai *et al.*, 2019).

I.2.3 Facteurs microbiens

I.2.3.1 Rôle du microbiote intestinal

Le tube digestif héberge 10^{14} microorganismes vivant en symbiose avec l'hôte, soit environ 10 fois plus que le nombre de cellules du corps humain (Cani, 2018). Ce microbiote intestinal est essentiellement composé de bactéries mais contient également des cellules eucaryotes, des virus, des champignons et des archées (Cani, 2018). La flore microbienne intestinale comprend plus de 1000 espèces bactériennes et est principalement abondante au niveau du côlon où la diversité et la densité de la population bactérienne sont maximales, atteignant 10^{11} à 10^{12} microorganismes par gramme de fèces (Cani, 2018) (**Figure 11**). Cette communauté assure une grande variété de fonctions, notamment l'éducation du système immunitaire, la sécrétion d'enzymes permettant la digestion de substrats non accessibles à l'hôte, le maintien de la barrière intestinale et la défense contre les microorganismes pathogènes (Lucas *et al.*, 2017). Parmi 100 phyla connus, 3 phyla rassemblent la plupart des populations dominantes du microbiote symbiotique : les *Firmicutes* (bactéries Gram positif représentant 30 à 52 % des séquences détectées et dont le phylum est principalement représenté par les *Clostridium*), les *Bacteroidetes* (représentant 9 à 42 % des séquences et représentés par les genres *Bacteroides*, *Prevotella* et *Porphyromonas*) et les *Actinobacteria* (environ 1 à 13 % des séquences et représentés par les *Bifidobacteria*). D'autres bactéries telles que les *Lactobacillae*, les *Streptococci* ou les *Enterobacteria*, constitué notamment de l'espèce *Escherichia coli*, représentent moins de 2% des séquences (Riaz Rajoka *et al.*, 2017).

I.2.3.2 Microbiote intestinal et maladie de Crohn

I.2.3.2.1 Le microbiote bactérien

La population bactérienne totale est plus abondante chez les patients atteints de MC comparativement aux sujets sains, que ce soit dans le mucus ou bien associé à la muqueuse intestinale (Swidsinski *et al.*, 2005) (**Figure 12**). Cependant, la diversité du microbiote est diminuée chez ces patients, avec la perte d'espèces appartenant aux genres *Bacteroides*, *Eubacterium* et

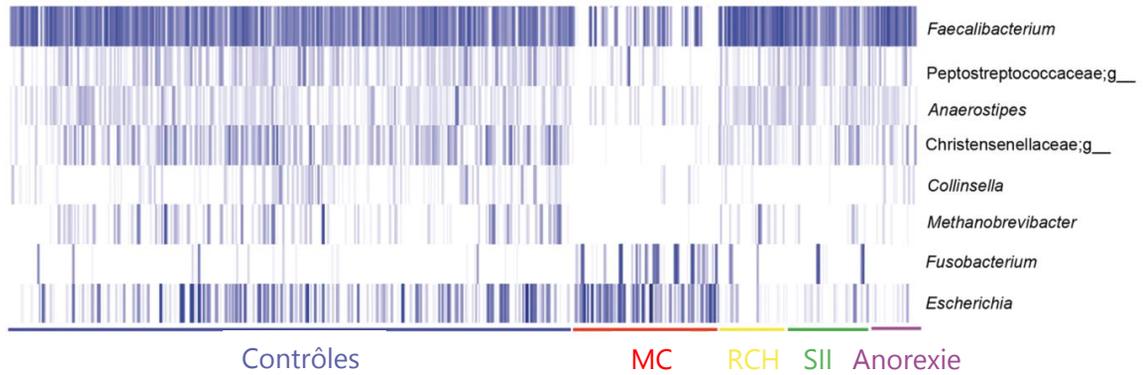


Figure 13 : Signature bactérienne de la MC basée sur 8 genres bactériens.

Validation du potentiel discriminant entre la MC et la RCH de l'association de 8 genres bactériens dans une cohorte de 2045 échantillons fécaux dont 1247 sujets sains, 339 patients atteints de MC, 158 patients atteints de RCH, 202 patients atteints du syndrome de l'intestin irritable (SII) et 99 patients souffrants d'anorexie. Chaque barre bleue indique la présence du groupe bactérien pour chaque sujet avec le gradient de couleurs : blanc = absent, bleu clair = faible abondance relative et sombre = abondance relative élevée. La MC se caractérise par un profil d'abondance pour ces 8 genres bactériens différent par rapport aux autres maladies testées et aux sujets sains (modifiée d'après Pascal *et al.*, 2017).

Lactobacillus (Ott, 2004) ou au phylum des *Firmicutes*, particulièrement *Faecalibacterium prausnitzii* possédant des propriétés anti-inflammatoires (Martinez-Medina *et al.*, 2006; Sokol *et al.*, 2008). Ces mêmes observations ont été réalisées à la fois chez les patients atteints de MC et leur frère ou sœur sain(e) comparativement aux sujets contrôles (Hedin *et al.*, 2016). D'autres bactéries réputées « bénéfiques » telles que celles appartenant au genre *Bifidobacterium* sont également diminuées chez les patients Crohn (Seksik *et al.*, 2003). La dysbiose observée chez ces patients est par ailleurs caractérisée par une augmentation de l'abondance en Enterobacteria, qui pourraient même représenter la flore intestinale dominante (Seksik *et al.*, 2003), et en certaines bactéries commensales possédant des caractéristiques pathogènes potentielles, appelées pathobiontes. Une expansion du phylum des *Proteobacteria* comprenant notamment les *E. coli* adhérents et invasifs, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp. ou encore *Salmonella* spp, ainsi que du phylum des *Actinobacteria* a été révélée chez les patients Crohn comparativement aux sujets sains (Frank *et al.*, 2007). Une signature bactérienne spécifique de la MC basée sur huit bactéries (*Faecalibacterium*, *Peptostreptococcaceae*, *Anaerostipes*, *Methanobrevibacter*, *Christensenellaceae*, *Collinsella*, *Fusobacterium* et *Escherichia*) a été établie et permet de discriminer les patients atteints de MC des sujets non atteints (**Figure 13**) (Pascal *et al.*, 2017). De plus, une différence dans la composition du microbiote intestinal après résection chirurgicale de la portion intestinale atteinte pourrait augmenter le risque de récurrence de la MC chez les patients entrés en rémission suite à cette opération (Yilmaz *et al.*, 2019).

La seule analyse de la composition du microbiote intestinal peut cependant être à l'origine d'une sous-estimation de l'impact de la dysbiose associée aux MICI et de ses répercussions sur la physiologie intestinale. Des analyses méta-génomiques indiquent que 12 % des voies métaboliques diffèrent entre les patients atteints de MICI et les sujets sains alors que seulement 2 % de la composition du microbiote diffère entre ces deux groupes (Morgan *et al.*, 2012). De manière similaire, une diminution du niveau de nombreux métabolites et de la diversité microbienne a été observée chez les patients atteints de MICI comparativement aux sujets non atteints de MICI (Franzosa *et al.*, 2019). Ces profils suggèrent une perte de la « diversité métabolique » analogue à la perte de la diversité taxonomique observée au niveau du microbiome des patients atteints de MICI. De plus, tandis que certains micro-organismes peuvent être très abondants mais rester en dormance dans l'intestin, la perte de certaines bactéries très actives métaboliquement pourrait avoir plus de conséquences que ce que laisserait supposer l'analyse de leur abondance génomique (Schirmer *et al.*, 2018). L'analyse de l' α -diversité microbienne et des voies métaboliques bactériennes dans les fèces de patients atteints de MC avant traitement par des anticorps anti-intégrine $\alpha 4\beta 7$ a révélé une augmentation de cette diversité associée à une augmentation de l'abondance de *Roseburia inulinivorans* et de l'espèce *Burkholderiales* chez les patients entrés en

Tableau 2 : Changements du microbiote fongique observés chez les patients adultes comparativement aux sujets sains ou à leurs parents non atteints.

↑, augmentation ; →, aucune modification ; ↓, diminution. (Modifié d'après Miyoshi *et al.*, 2018).

Type d'échantillon	Diversité fongique	Changement d'espèces	Charge fongique totale	Références
Biopsie colique	↑			Ott <i>et al.</i> , 2008
Muqueuse iléale	↑	↑ <i>Candida</i> spp, <i>Gibberella moniliformis</i> , <i>Alternaria brassicicola</i> et <i>Cryptococcus neoformans</i>		Li <i>et al.</i> , 2014
Fèces	↑	↑ <i>C. albicans</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> et <i>C. neoformans</i>		Li <i>et al.</i> , 2014
Fèces	↓	↑ <i>C. tropicalis</i>		Hoarau <i>et al.</i> , 2016
Fèces	→	↑ <i>C. albicans</i> , ↓ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Sokol <i>et al.</i> , 2017
Muqueuse colique	→	↑ Famille des Cystofilobasidiaceae et espèces de <i>C. glabrata</i>	↑	Liguori <i>et al.</i> , 2016

Tableau 3 : Changements du microbiote fongique observés chez les patients pédiatriques comparativement aux sujets sains ou à leurs parents non atteints.

→, aucune modification ; ↓, diminution. (Modifié d'après Miyoshi *et al.*, 2018).

Type d'échantillon	Diversité fongique	Changement d'espèces	Références
Fèces	↓	↑ <i>C. utilis</i> et <i>C. parapsilosis</i> , ↓ <i>Cladosporium cladosporioides</i>	Chehoud <i>et al.</i> , 2015
Biopsie muqueuse	→	↑ <i>Psathyrella</i> spp. et <i>Gymnopilus</i> spp	El Mouzan <i>et al.</i> , 2016
Fèces	→	↑ <i>Gymnopilus</i> spp. and <i>Hymenochaete</i> spp ↓ <i>Monilinia</i> spp	El Mouzan <i>et al.</i> , 2016
Fèces		↑ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Clavispora lusitanae</i> (<i>C. lusitanae</i>), <i>Cyberlindnera jadinii</i> (<i>C. utilis</i>), <i>C. albicans</i> et <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Lewis <i>et al.</i> , 2015

rémission 14 semaines après traitement comparativement aux patients dont la MC était toujours active après traitement. De plus, 13 voies métaboliques bactériennes étaient significativement enrichies chez ces les patients entrés en rémission après traitement comparativement aux patients dont la MC était toujours active après traitement, suggérant que l'analyse des fonctions du microbiote permettrait de prédire la réponse des patients atteints de MICI au traitement par ces anti-intégrines (Ananthakrishnan *et al.*, 2017).

1.2.3.2.2 Les microbiotes viral et fongique

Les microbiotes viral et fongique constituent une part importante des micro-organismes rencontrés dans l'intestin. Une modification et un enrichissement du microbiote viral ont été rapportés chez les patients atteints de MC, sans que cela ne puisse être expliqué par la diversité et la richesse bactérienne (Norman *et al.*, 2015). Une augmentation du niveau des transcrits des *Hepeviridae* et une diminution de l'abondance des *Virgaviridae* au niveau de la muqueuse a été rapportée chez les patients atteints de MC comparativement aux sujets contrôles, supportant l'idée que certains virus pourraient entraîner une inflammation et participer à la pathogenèse de la MC (Ungaro *et al.*, 2019).

Les profils fongiques au niveau intestinal et fécal chez des patients adultes et pédiatriques atteints de MICI ont été évalués au cours de différentes études, mettant en évidence tantôt une augmentation, tantôt une diminution ou encore aucun changement significatif de la diversité fongique, selon le type d'échantillon biologique analysé et la méthode employée pour évaluer la diversité (**Tableaux 2 et 3**). Chez les sujets adultes atteints de MICI, l'espèce *Candida* [notamment *C. albicans* (Sokol *et al.*, 2017), *C. tropicalis* et *C. glabrata* (Hoarau *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2014; Liguori *et al.*, 2016)] ainsi que *Gibberella moniliformis*, *Alternaria brassicola*, *Aspergillus clavatus* et *Cystofilobasidiaceae* (Li *et al.*, 2014; Liguori *et al.*, 2016) sont augmentés tandis que *Saccharomyces cerevisiae* (Ascomycota) et *Malassezia sympodialis* (Basidiomycota) sont diminués (Sokol *et al.*, 2017). A l'inverse, une augmentation de *S. cerevisiae* a été observée au niveau fécal par Lewis et coauteurs (Lewis *et al.*, 2015). Au niveau du microbiote fongique fécal, Sokol et coauteurs ont observé une association significative entre le ratio *Basidiomycota/Ascomycota* et le phénotype et la sévérité des MICI (Sokol *et al.*, 2017). Une augmentation de la richesse et de la diversité du microbiote fongique a été rapportée au niveau de la muqueuse inflammée comparativement à la muqueuse non inflammée des patients atteints de MC, avec une expansion de *Candida* spp., *Gibberella moniliformis*, *Alternaria brassicola*, et *Cryptococcus neoformans* dans les zones inflammées, positivement corrélée à l'expression de TNF- α , IFN- γ et IL-10 (Li *et al.*, 2014). L'analyse conjointe des microbiotes bactérien et fongique a également montré une corrélation très forte entre ces deux microbiotes chez les sujets sains, alors qu'ils sont déséquilibrés

chez les patients atteints de MC, suggérant l'existence d'altérations inter-règnes spécifiques à la maladie (Hoarau *et al.*, 2016; Sokol *et al.*, 2017).

I.2.3.2.3 Interactions entre microbiote et facteurs génétiques

Les facteurs génétiques d'un individu impactent fortement la composition et les fonctions de son microbiote intestinal ainsi que l'interaction entre les cellules immunitaires et les bactéries (Org *et al.*, 2015). Des souris déficientes pour le gène *Card9* (*caspase recruitment domain family member 9*), un gène présentant des polymorphismes à risque pour la MC, présentent un microbiote altéré augmentant la susceptibilité à une colite induite au DSS associée à une perte des cellules Th17 (Sokol *et al.*, 2013). En effet, cette dysbiose entraîne un défaut du métabolisme du tryptophane bactérien produisant des ligands du récepteur aryl hydrocarbène humain (AHR) dont la signalisation est importante pour la tolérance muqueuse, augmentant la susceptibilité à développer une colite (Lamas *et al.*, 2016). L'administration de *Lactobacillus* à ces souris, une bactérie capable de métaboliser le tryptophane en ligands AHR, est suffisante pour diminuer la colite. Un défaut des ligands AHR est également retrouvé au niveau fécal chez les patients atteints de MICI porteurs de polymorphismes à risque dans le gène *CARD9* (Lamas *et al.*, 2016).

Bacteroides fragilis est capable de protéger les souris d'une colite induite et de favoriser le développement des cellules Treg *via* l'autophagie et notamment les protéines NOD2 et ATG16L1 grâce aux vésicules de membrane externe (OMV, *outer membrane vesicles*) qu'elle sécrète. Un défaut des protéines NOD2 et ATG16L1 favoriserait ainsi la mise en place de l'inflammation (Chu *et al.*, 2016). Comparativement aux souris sauvages, les souris déficientes pour le gène *Nod2* présentent une plus faible diversité et un changement de la composition du microbiote (Lauro *et al.*, 2016), ainsi qu'une dérégulation des réponses immunitaires les prédisposant au développement d'une inflammation (de Souza *et al.*, 2018). Les études menées chez les patients atteints de MICI et porteurs de polymorphismes de *NOD2* rapportent une association entre ces polymorphismes et l'augmentation des *Enterobacteriaceae* associées à la muqueuse intestinale (Knights *et al.*, 2014) ainsi que des groupes *Clostridium coccoïdes* et *Eubacterium rectale* au niveau iléal (Li *et al.*, 2012), mais également une diminution du genre *Roseburia* et des bactéries *Faecalibacterium prausnitzii* au niveau fécal (Aschard *et al.*, 2019). Par ailleurs, la diminution de *Roseburia* a pu être observée à la fois chez des patients atteints de MICI et chez des sujets sains présentant un risque génétique élevé pour le développement des MICI, suggérant qu'une dysbiose microbienne pourrait précéder le développement des MICI (Imhann *et al.*, 2018). Plusieurs études ont révélé une association entre certains SNP et l'abondance de certains taxa fongiques (Sokol *et al.*, 2017) et bactériens (Rothschild *et al.*, 2018) chez les patients atteints de MICI. Cependant, cette dernière étude suggère que l'influence de la génétique de l'hôte sur son microbiote serait minimale, que seule une petite partie

du microbiote est héritable, et que les facteurs environnementaux auraient un impact bien plus important que les facteurs génétiques sur la composition du microbiote intestinal humain (Rothschild *et al.*, 2018).

Enfin, en libérant des miARN dans le lumen, les cellules épithéliales intestinales de l'hôte pourraient contrôler la composition de son microbiote. En effet, ces miARN eucaryotes pourraient pénétrer dans les bactéries et réguler spécifiquement des transcrits bactériens, affectant ainsi la croissance bactérienne (Liu *et al.*, 2016b). Malgré les disparités entre les modèles murins et l'Homme, l'ensemble de ces résultats démontre une interaction entre les facteurs génétiques de l'hôte et son microbiote intestinal, jouant un rôle dans la pathogenèse des MICI.

I.2.3.3 Implication d'agents pathogènes dans le développement de la MC

Les similitudes entre la MC et certaines formes de colites infectieuses (avec sécrétion de cytokines, augmentation du taux des bactéries dans la muqueuse, altération de la phagocytose...) et le fait que la maladie survienne fréquemment suite à des épisodes de gastro-entérites ou de diarrhées post-antibiotiques ont laissé supposer que certains agents infectieux à tropisme intestinal pourraient participer à l'étiologie de la MC (Sartor and Wu, 2017).

I.2.3.3.1 Implication d'un agent viral

La présence de plusieurs agents viraux tels que le virus Epstein Barr ou le virus de la rougeole a été recherchée dans les tissus des patients atteints de MC, mais les résultats n'ont pas permis de démontrer leur rôle exact dans la MC (Van Kruiningen *et al.*, 2007). Les souris hypomorphes pour *Atg16ll* (*Atg16ll^{HM}*), c'est-à-dire présentant un défaut d'expression d'*Atg16ll*, présentent des anomalies des cellules de Paneth suite à un contact avec une souche de norovirus particulière (CR6). Ce modèle murin, en condition axénique ou en absence de ce norovirus, possède des cellules de Paneth de morphologie normale (Cadwell *et al.*, 2010). Des anomalies identiques sont observées chez des patients atteints de MC porteurs du polymorphisme à risque *ATG16L1^{T300A}* et une infection à norovirus pourrait aggraver les symptômes des MICI (Khan *et al.*, 2009). L'implication d'une infection par le cytomégalovirus (CMV) a également été suggérée et permettrait de réactiver une maladie inflammatoire sous-jacente mais pas d'initier la maladie. De plus, la sévérité de l'inflammation est liée à l'intensité à laquelle le CMV est exprimé dans la muqueuse intestinale (Sipponen *et al.*, 2011). Cependant, il n'a pas été retrouvé une plus forte prévalence des anticorps anti-CMV chez les patients atteints de MC comparativement à la population générale (Lidar *et al.*, 2009). Ainsi, des infections virales pourraient révéler un phénotype associé à un polymorphisme à risque de la MC.

Les bactériophages, des virus infectant seulement les bactéries, seraient présents en nombre 10 fois supérieur à celui des bactéries dans le côlon des sujets sains et pourraient ainsi exercer une forte influence sur la diversité et la composition de la population bactérienne. Ils pourraient entraîner une dysbiose chez les patients atteints de MICI en déstabilisant les communautés bactériennes de manière directe en favorisant le transfert de gènes et une réorganisation du génome au sein de la population bactérienne, ou indirectement en diminuant l'activation et la prolifération des lymphocytes T et B (Łusiak-Szelachowska *et al.*, 2017). Chaque individu présenterait une colonisation par une famille phagique dominante (Wagner *et al.*, 2013). De plus, la communauté phagique totale associée à la muqueuse intestinale est plus abondante chez les patients atteints de MC par rapport à des individus sains mais la diversité de cette communauté est réduite (Wagner *et al.*, 2013). Une augmentation des bactériophages *Caudovirales* a été rapportée chez les patients atteints de MC ou de RCH comparativement aux sujets contrôles (Norman *et al.*, 2015) et dans les fèces de patients atteints de MC comparativement aux patients atteints de RCH mais pas aux sujets contrôles (Fernandes *et al.*, 2019). A l'inverse, la quantité de bactériophages est diminuée au niveau des zones ulcérées par rapport aux zones non-ulcérées chez les patients Crohn (Lepage *et al.*, 2008). Au cours d'une colite induite par un transfert de cellules T en modèle murin, la population de phages est altérée de manière similaire à ce qui est observé chez les patients atteints de MICI (Duerkop *et al.*, 2018). Une augmentation de l'abondance en certains phages tels que ceux infectant les *Clostridiales*, les *Streptococci* ou encore la bactérie *Alistipes* a été observée chez les animaux atteints de colite. L'expansion de la population de phages ciblant les *Alistipes* a été associée à une diminution de certains membres des *Bacteroidetes*, dont l'abondance décline au cours de la dysbiose (Duerkop *et al.*, 2018).

I.2.3.3.2 Implication de microorganismes fongiques

Le phosphopeptidomannane de paroi de levure a été identifié comme un antigène entraînant la production d'anticorps ASCA (*anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies*) (Standaert-Vitse *et al.*, 2006), dont la présence est un marqueur de la MC (Quinton *et al.*, 1998). La levure *Candida albicans* pourrait agir comme pathogène intestinal en entraînant la formation d'ASCA, puisqu'elle en exprime l'épitope majeur à sa surface, et pourrait ainsi être à l'origine d'une activation anormale du système immunitaire intestinal (Standaert-Vitse *et al.*, 2006). Les patients atteints de MC et les membres de leurs familles (non atteints) présentent une colonisation du tube digestif par *C. albicans* plus importante que la population générale (respectivement 44% et 38%, contre 22% pour la population générale) (Standaert-Vitse *et al.*, 2009). La proportion relative de *C. albicans* est également augmentée dans les fèces de patients atteints de MC (Sokol *et al.*, 2017). En modèle murin de colite induite au DSS, *C. albicans* aggrave la colite en augmentant la production de TNF-

α (Jawhara and Poulain, 2007). Enfin, la voie de différenciation lymphocytaire Th17, un élément important dans la physiopathologie de la MC, est activée lors d'une infection par *C. albicans* et est cruciale pour contrôler la colonisation par cette levure, que ce soit en modèle murin ou chez l'Homme (Kisand *et al.*, 2010).

I.2.3.3 Implication de bactéries pathogènes

Les similitudes entre la symptomatologie suite à une infection par des bactéries pathogènes appartenant aux espèces *Mycobacterium*, *Helicobacter*, *Yersinia*, *Listeria*, *Bacteroides*, *Clostridium* ou encore *Campylobacter* et celle observée dans les MICI laissent penser qu'un déclencheur pathogène pourrait être à l'origine de l'apparition des MICI (Bosca-Watts, 2015). Par exemple, la MC et la tuberculose intestinale partagent l'iléon terminal comme site de prédilection ainsi que la présence de lésions granulomateuses révélées par histopathologie. De plus, *Mycobacterium avium* sous-espèce *paratuberculosis* (MAP) est l'agent causal de la maladie de Johne, une iléite granulomateuse chronique des ruminants similaire à la MC. L'hypothèse d'une mycobactérie à l'origine de la MC a été suspectée dès la description anatomopathologique des lésions granulomateuses de la MC (Chiodini, 1989; Greenstein, 2003). Les résultats sont contradictoires en ce qui concerne l'isolement de cette bactérie chez les patients atteints de MC puisque seules quelques études parviennent à mettre en évidence la bactérie ou son ADN dans des biopsies intestinales de patients atteints de MC (McNees *et al.*, 2015). Et l'état actuel des connaissances semble plutôt réfuter l'implication de MAP dans l'étiologie de la MC.

Une implication des bactéries du genre *Helicobacter* dans la MC a également été suspectée. En effet, un parallèle peut être fait entre l'inflammation provoquée par *H. hepaticus* ou *H. bilis* dans différents modèles murins et la réponse immunitaire observée dans la MC (Chin *et al.*, 2000; Jergens *et al.*, 2007). Cependant, aucun rôle spécifique d'*Helicobacter* dans les MICI n'a pu encore être démontré chez l'Homme. La faible séroprévalence de *H. pylori* observée chez les patients atteints de MC suggère un rôle protecteur de cette infection dans le développement des MICI (Väre *et al.*, 2001). De plus, une association inverse entre la distribution géographique de *H. pylori* et la MC a été récemment rapportée (Shah *et al.*, 2017). Malgré tout, trois études portant sur un cas de RCH et trois cas de MC suggèrent que la thérapie administrée pour l'éradication de *H. pylori* pourrait déclencher une MICI latente, en induisant de profonds changements du microbiote intestinal (Chiba *et al.*, 2016; Jovanovic *et al.*, 2001; Tursi, 2006), tandis qu'une étude récente menée sur 127 patients atteints de MICI et 254 sujets contrôles réfute cette hypothèse (Rosania *et al.*, 2018).

L'implication de *Klebsiella pneumoniae*, une bactérie gram-négative responsable de pneumonies nosocomiales chez l'Homme, a été suggérée dans l'induction et la progression de la MC. En effet, des infections récurrentes à *K. pneumoniae* pourraient augmenter le titre des anticorps

dirigés contre cette bactérie. Cependant, ces anticorps ont une réactivité croisée dirigée contre les fibres de collagène de l'iléon terminal, activant ainsi la voie du complément et les cascades pro-inflammatoires, augmentant l'inflammation à ce niveau (Tiwana *et al.*, 2001). Des infections récurrentes à *K. pneumoniae* résultent en une attaque continue de la muqueuse colique par des cytokines variées, pouvant potentiellement conduire au développement de la MC (Lee and Kim, 2011).

L'hypothèse de la chaîne du froid suggère l'implication des bactéries psychotropes telles que *Yersinia* ou *Listeria* (Hugot *et al.*, 2003). Ces bactéries sont fréquemment retrouvées dans une grande variété d'aliments et ont été isolées au niveau de lésions chez des patients atteints de MC (Le Baut *et al.*, 2018). De nombreux aspects de la Yersiniose sont communs avec la MC, notamment la présence de granulomes (Gecse and Vermeire, 2018). Plusieurs espèces de *Yersinia* ont été identifiées au niveau intestinal chez des patients atteints de MC, les plus fréquemment retrouvées étant *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. intermedia* (Le Baut *et al.*, 2018). Deux cas d'iléites terminales impliquant *Y. pseudotuberculosis* et pour lesquels une MC a été par la suite diagnostiquée ont été rapportés par deux groupes indépendants (Homewood *et al.*, 2003; Zippi, 2006). *Listeria monocytogenes* pourrait représenter un bon candidat impliqué dans l'étiologie de la MC puisque son ADN a été détecté au niveau intestinal, que ce soit chez les patients contrôles ou atteints de MC (Chen *et al.*, 2000), et que la présence de ces bactéries a été identifiée au niveau de lésions de patients atteints de MC (Liu *et al.*, 1995). De plus, des souris déficientes pour le gène *Nod2* associé à la MC présentent une susceptibilité accrue à une infection orale par *L. monocytogenes*, mais sont résistantes à une infection systémique (Kobayashi *et al.*, 2005). Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer l'hypothèse d'une implication de *Yersinia* ou *Listeria* dans la MC.

Certaines souches de *Bacteroides fragilis*, dites entérotoxigènes, libèrent une toxine pro-inflammatoire de type métalloprotéase zinc-dépendante ayant été associée à des diarrhées chez l'enfant et l'adulte (Sears *et al.*, 2008) et pouvant induire une inflammation du côlon en modèle murin (Rabizadeh *et al.*, 2007). Bien que certaines études retrouvent ces bactéries et leur toxine chez environ 20 % des patients présentant une MICI active (Basset *et al.*, 2004; Prindiville *et al.*, 2000), d'autres ne montrent pas d'association entre les *B. fragilis* entérotoxigènes et la MC (Purcell *et al.*, 2018). De même, *Clostridium difficile* produit des toxines pouvant entraîner des troubles intestinaux plus ou moins graves et est considérée comme responsable de colites associées à l'utilisation d'antibiotiques et de maladies nosocomiales (Nitzan *et al.*, 2013). Bien que *C. difficile* n'entraîne pas l'apparition de la MC, elle peut induire une réactivation de la maladie et est plutôt considérée comme un facteur de risque d'exacerbation de la MC (Nitzan *et al.*, 2013). En modèle murin, l'incidence d'une infection à *C. difficile* est nulle chez les souris contrôles tandis qu'elle est

de 40 % chez des souris traitées au DSS et de 100 % chez celles ayant également reçu un traitement antibiotique. Cette infection est alors accompagnée de signes cliniques plus sévères, d'une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires plus importante et d'une mortalité plus élevée (Zhou *et al.*, 2018). Chez l'Homme, près de 10 % des patients atteints de MICI ont présenté ou présenteront une infection à *C. difficile* au cours de leur vie (Clayton *et al.*, 2009) faisant suite à un traitement antibiotique dans 42 % des cas seulement, contre 69 % dans la population générale (Bossuyt *et al.*, 2009). Enfin, bien qu'une augmentation de l'abondance des *Campylobacter* productrices de toxines ait été mise en évidence chez des patients atteints de MC comparativement aux sujets sains (Kaakoush *et al.*, 2014), ces bactéries ne seraient pas impliquées dans l'initiation des MICI (Nielsen *et al.*, 2019).

L'implication d'*E. coli* dans la MC est envisagée depuis longtemps, notamment suite à la découverte de taux élevés d'anticorps anti-*E. coli* chez les patients (Tabaqchali *et al.*, 1978). Depuis, la détection d'anticorps anti-*E. coli* dirigés notamment contre la protéine de membrane externe Omp (*outer membrane porin*) C a permis de confirmer l'implication de ces bactéries (Mow *et al.*, 2004). Des études sur biopsies intestinales de patients atteints de MC ont mis en évidence la présence de bactéries *E. coli* ainsi que d'antigènes spécifiques d'*E. coli*, notamment au niveau des macrophages et des cellules géantes à la base des ulcères, le long des fissures, dans les granulomes ou encore dans la *lamina propria* (Liu *et al.*, 1995; Swidsinski *et al.*, 2002). *E. coli* colonise anormalement les lésions iléales aiguës et chroniques des patients atteints de MC (représentant jusqu'à 100 % de la flore totale aéro-anaérobie) comparativement aux sujets contrôles (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998). Depuis, de nombreuses études à travers le monde ont rapporté une augmentation du nombre de bactéries *E. coli* ayant des propriétés invasives associées à la muqueuse intestinale chez les patients atteints de MC (Palmela *et al.*, 2017).

I.3 Marqueurs diagnostiques et stratégies thérapeutiques

I.3.1 Diagnostic de la maladie de Crohn

Le diagnostic de la MC repose d'abord sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques, endoscopiques et histologiques. Cependant, aucun test ne permet de poser à lui seul le diagnostic de la MC en raison de l'absence d'éléments spécifiques et de la variabilité d'expression de la MC. L'établissement du diagnostic de la MC nécessite ainsi d'exclure les autres pathologies infectieuses (telles qu'une infection à *Campylobacter*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, ou encore *E. coli*) ou non infectieuses (telles qu'une autre maladie inflammatoire, une malabsorption des carbohydrates, une immunodéficience, une néoplasie ou encore une intoxication médicamenteuse) donnant un tableau clinique analogue (Torres *et al.*, 2017).

Tableau 4 : Diagnostic différentiel de la MC et de la RCH.

pANCA, *perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*; ASCA, anticorps *anti-Saccharomyces cerevisiae* (modifié d'après Lee et Lee, 2016).

Caractéristiques	Rectocolite hémorragique	Maladie de Crohn
Atteinte rectale	Presque toujours	Fréquente
Atteinte de l'intestin	Rare	Fréquente
Lésions continues	Toujours	Peu fréquente
Profondeur des ulcérations	Muqueuse	Plus profonde que la muqueuse
Apparence pavimenteuse	Non	Oui
Sténose	Rare	Fréquente
Fistule	Non	Fréquente
Lésions périanales	Non	Fréquentes
pANCA	++	+
ASCA	+	++

La MC et la RCH présentent des symptômes communs et leur diagnostic différentiel est primordial, puisque les stratégies thérapeutiques médicales ou chirurgicales pour ces pathologies sont différentes (**Figure 1 et Tableau 4**). Dans la majorité des cas, le diagnostic différentiel entre la MC et la RCH nécessite la combinaison des examens endoscopiques et anatomo-pathologiques (Tontini, 2015).

I.3.2 Marqueurs diagnostiques

I.3.2.1 Les marqueurs protéiques et organiques

La recherche de marqueurs sériques et fécaux spécifiques de la MC présente un grand intérêt puisqu'ils permettraient une amélioration des diagnostics précoces ainsi que le suivi de la progression de la maladie et de la réponse des patients à une thérapie. Cependant, malgré l'étude d'une grande variété de marqueurs sériques ou fécaux dans le but de définir le marqueur « idéal », aucun n'est assez spécifique et sensible pour remplacer les diagnostics cliniques (Meuwis *et al.*, 2007). La poursuite de leur étude reste donc un enjeu majeur de la recherche translationnelle.

Au niveau sérique, outre les marqueurs classiques de l'inflammation (protéine C réactive, haptoglobine, TNF- α et IL-6), plusieurs marqueurs immunologiques ont été mis en évidence et permettent d'améliorer la fiabilité du diagnostic et la différenciation entre la MC et la RCH (Soubières, 2016). Ils peuvent être classés en deux groupes : les anticorps dirigés contre des résidus glucidiques et les anticorps dirigés contre des épitopes bactériens.

Les anticorps dirigés contre des résidus glucidiques les plus utilisés dans le diagnostic des MICI et dans la distinction entre la MC et la RCH sont les pANCA (*perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*) et les ASCA. Les pANCA sont des auto-anticorps qui reconnaissent des antigènes présents dans le cytoplasme, le noyau et les granules des polynucléaires neutrophiles tels que la cathepsine G, la β -glucuronidase, la lactoferrine, mais aussi les facteurs de transcription HMG (*high mobility group*) 1 et 2 (Kyriakidi, 2016). La prévalence des pANCA est de 50 à 70 % chez les patients atteints de RCH et de 6 à 20 % chez ceux atteints de MC, contre moins de 2,5 % dans la population contrôle (Peyrin-Biroulet *et al.*, 2007). Les ASCA sont des anticorps de type IgA ou IgG capables de reconnaître des résidus mannoses présents à la surface de la levure non pathogène *Saccharomyces cerevisiae* (Sendid *et al.*, 1996) mais aussi chez d'autres micro-organismes comme *Candida albicans* (Standaert-Vitse *et al.*, 2006) ou bien MAP (Müller *et al.*, 2008). La prévalence des ASCA est de 48 à 70 % chez les patients atteints de MC, de 5 à 15 % chez ceux atteints de RCH et de 0 à 5 % dans la population contrôle (Peyrin-Biroulet *et al.*, 2007).

Plusieurs anticorps dirigés contre des antigènes bactériens (autres que des motifs glucidiques) sont détectables chez les patients atteints de MC et servent également de marqueurs

Tableau 5 : Bilan des miARN dérégulés au niveau circulant chez les patients atteints de MC.
 En **gras**, les miARN surexprimés. PBMC, *peripheral blood mononuclear cell*.

miARN dérégulés	Type d'échantillons	Population (n)	Techniques utilisées	Références
miR-149, miRplus-F1065, 199a-5p, 362-3p, 340, 532-3p, et miRplus-E1271	Sang périphérique	MC active (n = 14) vs sujets contrôles (n = 13)	Microarray et qRT-PCR	Wu <i>et al.</i> , 2011
miR-149 et miR-340	Sang périphérique	MC inactive (n = 5) vs sujets contrôles (n = 13)	Microarray et qRT-PCR	Wu <i>et al.</i> , 2011
miR-505, 28-5p, 151-5p, 103-2, 199a-5p, 340, 362-3p, 532-3p, et miRplus-E1271	Sang périphérique	RCH active (n = 13) vs sujets contrôles (n = 13)	Microarray et qRT-PCR	Wu <i>et al.</i> , 2011
miR-505, 28-5p, 103-2, 149, 151-5p, 340, 532-3p, et miRplus-E1153	Sang périphérique	RCH active (n = 10) vs MC active (n = 14)	Microarray et qRT-PCR	Wu <i>et al.</i> , 2011
miR- 195, 16, 93, 140, 30e, 20a, 106a, 192, 21, 484, et let-7b	Sérum	MC active (n = 46) vs sujets contrôles (n = 32)	qRT-PCR	Zahm <i>et al.</i> , 2011
miR- 16, 23a, 29a, 106a, 107, 126, 191, 199a-5p, 200c, 362-3p, et 532-3p	Sang périphérique	MC active (n = 128) vs sujets contrôles (n = 162)	qRT-PCR	Paraskevi <i>et al.</i> , 2012
miR- 16, 21, 28-5p, 151-5p, 155, et 199a-5p	Sang périphérique	RCH active (n = 88) vs sujets contrôles (n = 162)	qRT-PCR	Paraskevi <i>et al.</i> , 2012
miR- 188-5p, 422a, 378, 500, 501-5p, 769-5p, et 874	Sang périphérique	RCH (n = 20) vs sujets contrôles (n = 20)	qRT-PCR	Duttagupta <i>et al.</i> , 2012
miR- 188-5p, 877, 140-5p, 145, 18a, 128	Sérum	MC active (n = 9) vs MC inactive (n = 9)	Microarray et qRT-PCR	Iborra <i>et al.</i> , 2013
miR- 223a-3p, 23a-3p, 302-3p, 191-5p, 22-3p, 17-5p, 30e-5p, 148b-3p, 320e, 1827, 612, et 188-5p	Sérum	RCH (n = 46) vs sujets contrôles (n = 21)	Microarray	Polytarchou <i>et al.</i> , 2015
miR-16	Sang périphérique	MC (n = 102) vs sujets contrôles	qRT-PCR	Jensen <i>et al.</i> , 2015
miR-19-3p	Sérum	MC sténosante (n = 46) vs MC non sténosante (n = 62)	qRT-PCR	Lewis <i>et al.</i> , 2015
miR-21, 31, 146a, 155	Sang périphérique	CD (n > 20) vs sujets contrôles (n > 20)	Microarray et qRT-PCR	Schaefer <i>et al.</i> , 2015
miR-21, 31, 146a, 19a, 101, 142-5p, 223, 375, 494	Sang périphérique	RCH (n > 20) vs sujets contrôles (n > 20)	Microarray et qRT-PCR	Schaefer <i>et al.</i> , 2015
miR- 595, 1246	Sérum	MC (n = 57) et RCH (n = 62) vs sujets contrôles (n = 58)	Microarray et qRT-PCR	Krissansen <i>et al.</i> , 2015
miR- 301a	PBMC	MC (n = 72) et RCH (n = 66) vs sujets contrôles (n = 32)	qRT-PCR	He <i>et al.</i> , 2016
miR-1183, 1286, 149-5p, 1827, 188-5p, 192-5p, 378c, 504, 574-5p et 30e-5p	Sérum	MC (n = 45) vs sujets contrôles (n = 21)	Nanostring nCounter	Oikonomopoulos <i>et al.</i> , 2016
miR- 223-3p	Sérum	MC (n = 50) et RCH (n = 50) vs sujets contrôles (n = 50)	qRT-PCR	Wang <i>et al.</i> , 2016
miR-125a	Plasma	MC active (n = 29) vs sujets contrôles (n = 37)	qRT-PCR	Sun <i>et al.</i> , 2017
miR- 29b-3p, 122-5p, 148a-3p, 150-5p, 192-5p, 194-5p, 146a-3p, 375, 199a-3p	Sérum	RCH (n = 12) vs sujets contrôles (n = 12)	qRT-PCR	Viennois <i>et al.</i> , 2017
miR- 106a, 362-3p	Sang périphérique	MC (n = 32) et RCH (n = 32) vs sujets contrôles (n = 32)	qRT-PCR	Omidbakhsh <i>et al.</i> , 2018
miR- 16, 21 et 223	Sérum	MC (n = 43) vs sujets contrôles (n = 35)	qRT-PCR	Schönauen <i>et al.</i> , 2018
miR- 16, 21 et 223	Sérum	RCH (n = 18) vs sujets contrôles (n = 35)	qRT-PCR	Schönauen <i>et al.</i> , 2018
miR- 16, 21 et 223	Sérum	MC (n = 43) vs RCH (n = 18)	qRT-PCR	Schönauen <i>et al.</i> , 2018
miR- 598 et 642	Plasma	RCH (n = 21) vs MC (n = 12)	Taqman low-density array et qRT-PCR	Netz <i>et al.</i> , 2018
miR- 4448, 548g-3p, 4536-5p, 30a-3p, 548q, 4461, 133a-3p, 597-5p, 619-3p, 644a, 1268a, 1297, 1909-3p, 197-3p, 197-5p, 410-3p, 936, 542-5p, 549a, 603, 874-3p, 92a-3p, 933, 941	PMBC	MC inactive (n = 10) vs sujets contrôles (n = 39)	Nanostring nCounter	Mohammadi <i>et al.</i> , 2018
miR- 874-3p, 933, 129-5p, 1909-3p, 212-3p, 885-5p, et 619-3p	PMBC	MC colique (n = 11) vs RCH (n = 46)	Nanostring nCounter	Mohammadi <i>et al.</i> , 2018
miR- 631, 4521, 562, 766-3p, 302b-3p, 423-3p, 484, 4707-3p, 483-3p, 4516, 665, 2117, 216b-5p, 296-5p, 27b-3p, 188-3p, 770-5p, 1233-3p, 4755-5p, 627-3p, 767-3p, 339-5p, 1268a, 1297, 1909-3p, 197-3p, 197-5p, 410-3p, 936, 542-5p, 549a, 603, 874-3p, 92a-3p, 933, 941	PMBC	MC active (n = 25) vs sujets contrôles (n = 39)	Nanostring nCounter	Mohammadi <i>et al.</i> , 2018
miR- 146b-5p	Sérum	MC (n = 166) et RCH (n = 100) vs sujets contrôles (n = 141)	qRT-PCR	Chen <i>et al.</i> , 2019

biologiques dans les MICI. Les anticorps IgG ou IgA anti-OmpC sont présents chez 20 à 55 % des patients atteints de MC et sont régulièrement associés à des formes familiales et fistulantes de la maladie (Peyrin-Biroulet *et al.*, 2007). Des taux importants d'IgG anti-CBir1, dirigée contre la flagelline des bactéries du sous-phylum *Clostridium*, ont été retrouvés chez environ 50 % des patients atteints de MC (Peyrin-Biroulet *et al.*, 2007).

Les trois marqueurs fécaux les plus communément recherchés dans les MICI sont la calprotectine, la lactoferrine et la protéine S100A12. Leur présence peut aider au diagnostic, à l'évaluation de l'activité de la maladie et à la prédiction d'une éventuelle récurrence. La calprotectine, protéine liant le zinc et le calcium, est présente en grande quantité dans les polynucléaires neutrophiles. La concentration en calprotectine est proportionnelle à l'infiltrat de la muqueuse intestinale par les neutrophiles. Elle représente un très bon marqueur de l'inflammation intestinale (Sands, 2015) et permettrait de suivre la progression de la MC (Kennedy *et al.*, 2019). La lactoferrine, glycoprotéine liant le fer, est exprimée par les polynucléaires neutrophiles activés. Elle est libérée par les tissus endommagés dans le but de se défendre contre une infection (Kruzel *et al.*, 2017). S100A12, protéine de liaison du calcium aussi appelée Calgranuline C, est produite par les polynucléaires neutrophiles activés et interagit avec le récepteur multi-ligands RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) présent au sein des macrophages, de l'endothélium et des lymphocytes. S100A12 est fortement exprimée par les tissus intestinaux en conditions inflammatoires et serait ainsi un marqueur fiable pour le suivi de l'activité de la MC et de la RCH (van de Logt and Day, 2013). De la même manière, la NGAL (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) est augmentée au niveau fécal et plasmatique chez les patients atteints de MC ou de RCH comparativement aux sujets sains (Thorsvik *et al.*, 2017). Une variation des profils en miARN fécaux a également été mise en évidence chez les patients atteints de MICI comparativement aux sujets contrôles (Verdier *et al.*, 2019). Cependant, l'ensemble de ces marqueurs fécaux ne permettent pas de différencier la MC de la RCH. Récemment, une étude pédiatrique a montré que l'analyse des profils des composés organiques volatils dans les selles pouvait permettre de discriminer les patients atteints de MC, de RCH, et les individus contrôles et ce, en phase active ou de rémission de la maladie (Ahmed *et al.*, 2016).

I.3.2.2 Les microARN

Plusieurs études ont mis en évidence une altération du profil en miARN à la fois au niveau périphérique (sang, plasma, sérum, cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) ; **Tableau 5**) et tissulaire (**Tableau 6**) chez les patients atteints de MC et de RCH comparativement aux sujets contrôles, faisant des miARN des biomarqueurs potentiels de ces pathologies pouvant être accessibles par une simple prise de sang et permettant le diagnostic différentiel entre la MC et

Tableau 6 : Bilan des miARN dérégulés au niveau tissulaire chez les patients atteints de MC.
En **gras**, les miARN surexprimés.

miARN dérégulés	Type d'échantillons	Population (n)	Techniques utilisées	Références
miR-192, 375, 422b, 16, 21, 23a, 24, 29a, 126, 195, et let-7f	Côlon sigmoïde	RCH active (n = 15) vs sujets contrôles (n = 15)	Microarray et qRT-PCR	Wu <i>et al.</i> , 2008
miR-21 et 155	Côlon sigmoïde	RCH active (n = 12) vs sujets contrôles (n = 12)	Microarray et qRT-PCR	Takagi <i>et al.</i> , 2010
miR-19b, 629, 23b, 106a, et 191	Côlon sigmoïde	RCH active (n = 5) vs sujets contrôles (n = 13)	Microarray et qRT-PCR	Wu <i>et al.</i> , 2010
miR-16, 21, 223, et 594	Iléon terminal	MC active (n = 6) vs sujets contrôles (n = 13)	Microarray et qRT-PCR	Wu <i>et al.</i> , 2010
miR-188-5p, 215, 320a, 346, 7, 31, 135b, 223, 29a, 29b, 126*, 127-3p, et 324-3p	Côlon	RCH active (n = 8) vs sujets contrôles (n = 8)	qRT-PCR	Fasseu <i>et al.</i> , 2010
miR-188-5p, 215, 320a, 346, 196a, 29a, 29b, 126*, 127-3p, et 324-3p	Côlon	RCH inactive (n = 8) vs sujets contrôles (n = 8)	qRT-PCR	Fasseu <i>et al.</i> , 2010
miR-9, 126, 130a, 181c, 375, 26a, 29b, 30b, 34c-5p, 126, 127-3p, 133b, 155, 196a, 324-3p, 21, 22, 29c, 31, 106a, 146a, 146b-3p, et 150	Côlon	MC active (n = 8) vs sujets contrôles (n = 8)	qRT-PCR	Fasseu <i>et al.</i> , 2010
miR-9, 30a, 30c, 223, 26a, 29b, 30b, 34c-5p, 126, 127-3p, 133b, 155, 196a, 324-3p, 21, 22, 29c, 31, 106a, 146a, 146b-3p, et 150	Côlon	MC inactive (n = 8) vs sujets contrôles (n = 8)	qRT-PCR	Fasseu <i>et al.</i> , 2010
miR-150, 196b, 199a-3p, 199b-5p, 223, et 320a	Côlon	RCH inactive (n = 8) vs MC inactive (n = 8)	qRT-PCR	Fasseu <i>et al.</i> , 2010
miR-7	Côlon	MC active (n = 8) vs sujets contrôles (n = 6)	qRT-PCR	Nguyen <i>et al.</i> , 2010
miR-150	Côlon	RCH active (n = 5) vs sujets contrôles (n = 4)	qRT-PCR	Bian <i>et al.</i> , 2011
miR-196	Côlon	MC active (n = 83) vs sujets contrôles (n = 67)	qRT-PCR, Hybridation <i>in situ</i>	Brest <i>et al.</i> , 2011
miR-143 et 145	Côlon	RCH active (n = 8) vs sujets contrôles (n = 8)	qRT-PCR	Pekow <i>et al.</i> , 2012
miR-20b	Côlon	RCH active (n = 20) vs sujets contrôles (n = 20)	Microarray et qRT-PCR	Coskun <i>et al.</i> , 2013
let-7e	Côlon	RCH inactive (n = 19) vs sujets contrôles (n = 20)	Microarray et qRT-PCR	Coskun <i>et al.</i> , 2013
miR-98	Côlon	RCH inactive (n = 19) vs RCH active (n = 20) et sujets contrôles (n = 20)	Microarray et qRT-PCR	Coskun <i>et al.</i> , 2013
miR-18a, 629, let-7b, 140-3p, 422a, 885-5p, 328	Côlon	MC active (n = 9) vs MC inactive (n = 9)	Microarray et qRT-PCR	Iborra <i>et al.</i> , 2013
miR-650, 548a-3p , 630, 489, 196b	Côlon	RCH active (n = 9) vs RCH inactive (n = 9)	Microarray et qRT-PCR	Iborra <i>et al.</i> , 2013
miR-19b, 23b, 106a, 629	Côlon	MC (n = 14) vs sujets contrôles (n = 11)	qRT-PCR	Lin <i>et al.</i> , 2013
miR-19b, 106a, 629	Côlon	MC (n = 14) vs RCH (n = 12)	qRT-PCR	Lin <i>et al.</i> , 2013
miR-30c et 130a	Iléon	MC active (n = 10) vs MC inactive (n = 10) ; RCH (n = 20) vs sujets contrôles (n = 13)	qRT-PCR	Nguyen <i>et al.</i> , 2014
miR-106b et 93	Côlon	MC active (n = 22) vs MC inactive (n = 16) et sujets contrôles (n = 41)	Hybridation <i>in situ</i> , Immunohistochimie	Lu <i>et al.</i> , 2014
miR-31, 146a, 206, 424, 663, 194b, 216b, 548e, 559	Côlon	MC (n = 9) et RCH (n = 10) vs contrôles (n = 18)	qRT-PCR	Lin <i>et al.</i> , 2014
miR-31, 146a, 206, 424	Côlon	MC (n = 9) vs RCH (n = 10)	qRT-PCR	Lin <i>et al.</i> , 2014
miR-155	Côlon	RCH active (n = 20) vs sujets contrôles (n = 16)	Microarray et qRT-PCR	Min <i>et al.</i> , 2014
miR-31-5p, 203	Côlon	MC (n = 21) vs sujets contrôles (n = 14)	qRT-PCR	Peck <i>et al.</i> , 2015
miR-31, 101, 146a	Côlon	MC (n > 20) vs sujets contrôles (n > 20)	Microarray et qRT-PCR	Schaefer <i>et al.</i> , 2015
miR-19a, 21, 31, 101	Côlon	RCH (n > 20) vs sujets contrôles (n > 20)	Microarray et qRT-PCR	Schaefer <i>et al.</i> , 2015
miR-4284	Côlon	RCH (n = 26) vs sujets contrôles (n = 19)	qRT-PCR	Koukos <i>et al.</i> , 2015
miR-595 et 1246	Côlon	MC active vs MC inactive ; RCH active vs RCH inactive	Microarray et qRT-PCR	Krissansen <i>et al.</i> , 2015
miR-192-5p	Iléon	MC active (n = 16) vs sujets contrôles (n = 10)	Microarray et qRT-PCR	Guo <i>et al.</i> , 2015
miR-495-5p, let-7b-5p	Iléon	MC non active (n = 16) vs sujets contrôles	Microarray et qRT-PCR	Guo <i>et al.</i> , 2015
miR-361-3p, 124-3p	Iléon	MC active (n = 16) vs MC non active (n = 16)	Microarray et qRT-PCR	Guo <i>et al.</i> , 2015
miR-147b, 383, 615, 1826 et 194-2	Côlon	MC (n = 19) vs RCH (n = 30)	Séquençage et qRT-PCR	Lin <i>et al.</i> , 2016
miR-18a, 20a, 21, 31, 99a, 99b, 100, 125a, 126, 142-5p, 146a, 185, 204, 221 et 223	Côlon	MC (n = 25) vs sujets contrôles (n = 11)	Séquençage et qRT-PCR	Béres <i>et al.</i> , 2017
miR-31, 125a, 146a et 142-3p	Côlon inflammé	MC (n = 15) vs RCH (n = 10)	Séquençage et qRT-PCR	Béres <i>et al.</i> , 2017
miR-203a-3p, 194-5p, 192-5p, 215-5p, 10b-5p, 10a-5p, 337-5p, 582-5p, 223-3p	Côlon sigmoïde et iléon terminal	MC inactive (n = 23) vs sujets contrôles (n = 38)	NanoString miRNA expression assay	Mohammadi <i>et al.</i> , 2019

la RCH. En effet, 8 miARN du sang périphérique permettaient de distinguer la MC de la RCH en phase active des maladies (Wu *et al.*, 2011). Deux miARN, les miR-598 et miR-642, différemment exprimés dans le plasma de patients atteints de MC ou de RCH permettraient eux aussi de distinguer ces deux pathologies (Netz *et al.*, 2018). Enfin, un panel de 6 miARN différemment exprimés dans les biopsies de patients atteints de MC ou RCH permet de discriminer ces deux pathologies (Schaefer *et al.*, 2015) (**Tableaux 5 et 6**).

Les miARN pourraient également aider à l'identification du phénotype clinique et à la prédiction de l'évolution des MICI. En effet, des polymorphismes des gènes codant les miR-122 et miR-196a2 ont été associés à une MC iléale et à une RCH latérale gauche, tandis qu'un polymorphisme du gène codant le miR-124a a été associé à une MC colique (Ciccacci *et al.*, 2017). L'analyse d'un panel de 5 miARN dans des biopsies coliques permettrait de stratifier les patients atteints de MC en fonction du phénotype de la maladie (pénétrante ou non, sténosante ou non) tandis que l'analyse du niveau du miR-215 dans ces biopsies prédirait la probabilité de progression vers une maladie pénétrante ou sténosante (Peck *et al.*, 2015).

L'expression différentielle des miARN au niveau circulant ou fécal pourrait aider à estimer l'activité de la MC. Les patients atteints de MC active présentent une augmentation des miR-188-5p et miR-877 et une diminution des miR-140-5p, miR-145, miR-18a, miR-128 au niveau sérique comparativement aux patients atteints de MC inactive (Iborra *et al.*, 2013). Une augmentation du niveau des miR-595 et miR-1246 dans le sérum (Krissansen *et al.*, 2015) et une diminution du miR-125a dans le plasma (Sun *et al.*, 2017) ont été rapportées chez les patients atteints de MC active comparativement aux patients présentant une MC inactive. Les niveaux de 3 autres miARN du sérum, les miR-1286 et miR-1273d (Oikonomopoulos *et al.*, 2016), ainsi que le miR-146b-5p (Chen *et al.*, 2019) ont été significativement corrélés à l'activité de la MC et présentent une spécificité plus importante que la protéine C réactive couramment utilisée pour déterminer l'activité de la maladie. Une augmentation des miR-155 et miR-223 au niveau fécal a été rapportée chez les patients atteints de MICI comparativement aux patients contrôles et leur expression est corrélée à d'autres marqueurs tels que la calprotectine fécale ou la protéine C réactive, suggérant que les miARN fécaux pourraient également être utilisés en tant que biomarqueurs dans le diagnostic des MICI (Schönauen *et al.*, 2018).

I.3.3 Traitements cliniques conventionnels

Aucun traitement n'est actuellement en mesure de guérir la MC. Les thérapies utilisées à l'heure actuelle ont pour objectif le traitement symptomatique des poussées et la prévention des récurrences. Cependant, l'arsenal thérapeutique ne cesse de s'étoffer et deux stratégies principales

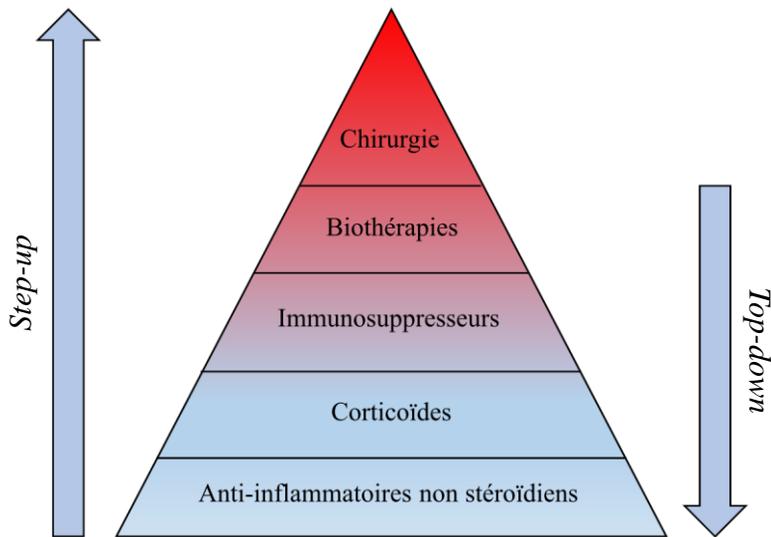


Figure 14 : Approche thérapeutique dans le traitement de la maladie de Crohn.

La première stratégie dite *Step-up* consiste en une approche thérapeutique progressive en fonction de l'activité de la maladie pouvant ainsi aller de l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens jusqu'à un recours à la chirurgie dans les cas les plus sévères. La seconde stratégie, dite *Top-down*, consiste en un traitement intensif par biothérapies (anti-TNF- α , anti-intégrine $\alpha 4\beta 7$...) associé le plus souvent à des immunosuppresseurs dès le début de la thérapie.

s'opposent : (i) la stratégie ascendante classique dite *Step-up* et (ii) la stratégie descendante dite *Top-down* (**Figure 14**).

Le principe de la stratégie ascendante classique *Step-up* est d'adapter progressivement les traitements en fonction de la sévérité et de l'évolution de la maladie. En présence de poussées légères de la MC, des anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que les dérivés salicylés (salazosulfasalazine [Salazopyrine®], olsalazine [Dipentum®] et la mésalazine [Pentasa®, Rowasa®]) sont utilisés. En cas de poussées modérées de la maladie, un traitement associant des anti-inflammatoires non stéroïdiens et des corticoïdes tels que le budésonide (Pulmicort®) et le prédnisolone (Solupred®) est privilégié. Puis en cas de rechute et d'évolution sévère de la MC, des immunosuppresseurs comme l'azathioprine (Imurel®, méthotrexate) peuvent être employés et en cas d'échec, des anticorps monoclonaux dirigés contre le TNF- α tels que l'Infliximab (Rémicade®), l'Adalimumab (Humira®) et le Certolizumab (Cymzia®), efficaces chez les patients ayant une atteinte très sévère de MC, sont utilisés (Chang and Hanauer, 2017). D'autres anticorps monoclonaux ont été récemment montrés comme prometteurs et efficaces dans le traitement de la MC : le Vedolizumab, un anticorps monoclonal anti-intégrine $\alpha 4\beta 7$, protéine permettant aux leucocytes d'adhérer à l'endothélium au niveau du tube digestif (Sandborn *et al.*, 2013), l'Ustekinumab, un anticorps monoclonal dirigé contre la sous-unité p40 de l'IL-12 et l'IL-23 et efficace à long terme (Sandborn *et al.*, 2018) et le MEDI2070, un anticorps dirigé contre la sous-unité p19 de l'IL-23 (Sands *et al.*, 2017). En cas d'évolution défavorable de la maladie ou de survenue de complications (sténoses, fistules), l'acte chirurgical (résection de tout ou d'une partie de l'intestin ulcéré) est nécessaire. Cinquante pour cent des patients subissent une intervention chirurgicale dans les 10 ans qui suivent le diagnostic de la MC et un tiers d'entre eux auront recours à la chirurgie plusieurs fois (Cosnes *et al.*, 2012). Cependant, l'exérèse des segments atteints ne protège pas des récurrences. Il semblerait que les récurrences post-opératoires soient plus fréquentes dans les formes inflammatoires de MC que dans les formes avec complications, comme des sténoses ou encore des occlusions (Buisson *et al.*, 2012).

La stratégie descendante *Top-down* repose sur un traitement intensif par biothérapie dès les premières poussées de la maladie. Cette stratégie thérapeutique agressive précoce fait donc directement appel à des anticorps anti-TNF- α associés à des immunosuppresseurs. Il a été montré dans l'essai clinique de D'Haens, réalisé sur 129 malades naïfs pour les corticoïdes, les immunosuppresseurs et les anti-TNF- α , que la rémission clinique et la guérison endoscopique était plus fréquemment observée suite à l'utilisation d'une stratégie *Top-down* comparativement à une stratégie *Step-up* (61,5% *versus* 42,2% respectivement). Toutefois, cette différence n'est plus significative au-delà d'un an de traitement (D'Haens *et al.*, 2008). Ainsi plusieurs questions restent à éclaircir concernant l'utilisation d'un traitement initial fort : (i) quels sont les risques de cette

stratégie chez des patients qui n'auraient peut-être eu qu'une évolution légère de la maladie ?, (ii) quelle sera la tolérance à long terme de ce genre de traitement ? En l'état actuel des connaissances, il est donc difficile de conclure sur la meilleure option de traitement des patients atteints de MC mais il est très probable qu'à l'avenir des traitements à la carte soient de plus en plus privilégiés.

I.3.4 Approches thérapeutiques ciblant les agents infectieux

Etant donné le nombre croissant d'arguments en faveur d'une étiologie infectieuse de la MC, des approches thérapeutiques visant à manipuler le microbiote intestinal ont été développées et reposent sur l'utilisation d'antibiotiques, de prébiotiques, de symbiotiques et de probiotiques et sur la transplantation du microbiote fécal.

I.3.4.1 Antibiotiques

L'effet bénéfique des antibiotiques à large spectre dans le traitement de la MC a été suggéré suite à la méta-analyse de 10 études cliniques comparant l'effet de ce type de traitement sur la MC à celui d'un placebo (Wang *et al.*, 2012b). Une thérapie basée sur la ciprofloxacine est aussi efficace que la méosalazine dans le traitement de la MC (Colombel *et al.*, 1999). Un essai clinique mené dans des centres américains et canadiens a rapporté que le métronidazole, un antibiotique actif contre les bactéries anaérobies strictes, est plus efficace chez les patients atteints de MC qu'un placebo, que ce soit à faible ou à forte dose (10 ou 20 mg/kg par jour) (Sutherland *et al.*, 1991). La combinaison de la ciprofloxacine et du métronidazole s'est avérée efficace dans le traitement des phases aiguës de la maladie (Prantera *et al.*, 1996). Un traitement combiné à l'azithromycine et au métronidazole présente également un effet bénéfique comparativement au métronidazole seul, avec l'obtention d'une rémission dans 66 % des cas contre 39 % des cas respectivement ainsi qu'une diminution significative de la calprotectine fécale dans le groupe azithromycine/métronidazole (Levine *et al.*, 2019).

Malgré l'efficacité des antibiotiques dans certains cas, des effets secondaires ont été recensés tels que des effets non spécifiques contre le microbiote, la possibilité du développement de résistances et le risque de surinfection à *Clostridium difficile*. Les antibiotiques ont néanmoins été recommandés en tant que seconde ligne thérapeutique pour la MC (Nitzan *et al.*, 2016).

I.3.4.2 Prébiotiques, probiotiques et symbiotiques

Puisqu'une dysbiose intestinale a été proposée comme causant la MC chez des individus génétiquement prédisposés, des stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation de prébiotiques, probiotiques et symbiotiques ont été développées afin de moduler le déséquilibre du microbiote intestinal observé chez les patients atteints de MC.

Les prébiotiques sont des aliments non digestibles comme les oligosaccharides ou les fibres alimentaires qui améliorent la croissance et l'activité du microbiote intestinal résident de façon bénéfique pour l'hôte. Bien que certaines études aient rapporté que l'administration de prébiotiques permettrait de diminuer l'activité de la MC en modifiant la composition du microbiote intestinal, d'autres études ont rapporté aucun effet des prébiotiques sur ce point (Floch, 2018). Ainsi, malgré les aspects prometteurs de l'utilisation des prébiotiques dans le traitement de la MC, les données expérimentales ne sont pas suffisantes pour conclure quant à leur efficacité.

Les mécanismes d'action des probiotiques dépendent de la souche microbienne et peuvent passer par des interactions compétitives avec les entéropathogènes, la production de métabolites anti-microbiens, des effets sur l'épithélium, et l'immunomodulation (Veerappan *et al.*, 2012). Plusieurs souches de probiotiques ont été testées pour l'induction de la rémission et la prévention de la rechute chez les patients atteints de MC. Au total, 12 études concernant la supplémentation en probiotiques des patients MC ont été menées, dont 7 ne présentant pas d'effet bénéfique des probiotiques (Coqueiro *et al.*, 2019). Ainsi, les propriétés thérapeutiques des probiotiques dans la MC demeurent controversées et la supplémentation en probiotiques a été considérée comme inefficace dans l'induction et le maintien de la rémission chez les patients atteints de MC dans les dernières directives concernant la nutrition clinique des patients atteints de MICI publiées par l'*European Society for Parenteral and Enteral Nutrition* (ESPEN) (Forbes *et al.*, 2017).

Les symbiotiques correspondent à une combinaison de probiotiques et de prébiotiques dans laquelle les prébiotiques augmentent la survie des souches probiotiques et stimulent l'activité de la microflore de l'hôte. Trois études cliniques concernant la supplémentation en symbiotiques des patients atteints de MC ont été menées, dont une ne présentant pas d'effet bénéfique pour ces composés (Wasilewski *et al.*, 2015). Ainsi, comme pour les prébiotiques et les probiotiques, les effets bénéfiques des symbiotiques demeurent controversés dans le traitement de la MC.

I.3.4.3 Transplantation de microbiote fécal

Etant donné le rôle potentiel joué par le microbiote intestinal dans la pathogenèse de la MC, la transplantation de microbiote fécal a été considérée comme nouvelle approche thérapeutique. Le transfert du microbiote fécal a depuis longtemps été utilisé dans le traitement de l'infection récalcitrante à *Clostridium difficile* avec un taux d'efficacité de plus de 80 %, à la fois lors d'une administration par coloscopie ou par administration orale de selles encapsulées (Saha and Khanna, 2019). Des transplants de microbiote fécal ont également été utilisés pour prendre en charge les infections à *C. difficile* chez les patients atteints de MC, et se sont avérés efficaces chez la majorité des patients avec une diminution ou une résolution complète de la diarrhée associée à l'infection (Anderson *et al.*, 2012). Concernant le traitement des MICI, une analyse systématique de 18 études

portant sur l'effet d'une transplantation de microbiote fécal ayant inclus 122 patients atteints de MC ou de RCH a rapporté l'entrée en rémission de 22 % des patients atteints de RCH et 61 % des patients atteints de MC (Colman and Rubin, 2014). De même, une étude menée sur 19 patients atteints de MC a montré qu'une transplantation de microbiote fécal par coloscopie, en une dose unique, permet d'améliorer la symptomatologie clinique de 58 % des patients traités (Vaughn *et al.*, 2016). Cette observation est accompagnée d'une augmentation du niveau de Treg au niveau de la *lamina propria* des patients receveurs ainsi que d'une plus grande diversité microbienne, suggérant un rétablissement de la balance microbienne et une diminution de l'inflammation (Vaughn *et al.*, 2016).

Après une transplantation de microbiote fécal, 30 à 50 % du microbiote bactérien du donneur persiste chez le receveur (Li *et al.*, 2016c). Malgré la possibilité d'une survenue d'effets indésirables généralement légers à modérés et touchant environ 10 % des patients (Wang *et al.*, 2016d) et l'absence de recul quant aux conséquences à long terme, la transplantation de microbiote fécal dans le cadre des MICI semble, à l'heure actuelle, être une stratégie prometteuse.

I.3.4.4 Potentiel thérapeutique des miARN

Les miARN pourraient jouer un rôle dans la thérapie de la MC. Le miR-19b, diminué au niveau intestinal chez les patients atteints de MC en phase active de la maladie, permet de réguler directement l'expression de SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*), modulant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires et limitant l'inflammation (Cheng *et al.*, 2015a). L'administration d'un miARN précurseur du miR-19b au niveau du côlon de souris traitées au TNBS diminue le score histologique et améliore l'inflammation (Cheng *et al.*, 2015a). De même, dans un modèle murin de colite induite au DSS, l'administration intrapéritonéale d'un vecteur permettant la surexpression du miR-146b permet d'améliorer la fonction barrière de l'épithélium et de limiter l'inflammation en diminuant indirectement l'expression de l'ubiquitine ligase SIAH2 (*Seven in absentia homolog 2*) et l'ubiquitinylation des protéines TRAF (*TNF receptor-associated factor*), activant ainsi la voie NF- κ B (Nata *et al.*, 2013). Enfin, des microsphères contenant le miR-31 administrées au niveau du côlon à des souris présentant une colite suite à un traitement au DSS ou au TNBS sont retrouvées au niveau de l'épithélium du côlon et diminuent l'intensité de la colite, permettant la régénération de l'épithélium (Tian *et al.*, 2019). Nous avons montré *in vitro* et *in vivo* que l'inhibition des miR-30c et miR-130a dans les cellules épithéliales en utilisant les miARN anti-sens correspondants abolit l'inhibition de l'autophagie induite par les AIEC, permettant ainsi d'établir une élimination efficace des AIEC et d'inhiber l'inflammation intestinale (Nguyen *et al.*, 2014). Ceci suggère que le ciblage de ces miARN pourrait être une stratégie thérapeutique prometteuse dans le cadre du traitement des patients porteurs d'AIEC.

II. *Escherichia coli* adhérents et invasifs et maladie de Crohn

II.1 Le pathovar AIEC associé à la maladie de Crohn

II.1.1 Généralités

D'après les caractéristiques pathogéniques des souches d'*E. coli* associées à la MC qui ne présentent aucun facteur de virulence retrouvés chez les autres pathotypes d'*E. coli*, un nouveau groupe d'*E. coli* pathogènes associé à la MC a été créé et dénommé AIEC pour *adherent-invasive E. coli* (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). Les critères d'inclusion dans ce groupe sont (i) la capacité à adhérer et envahir les cellules épithéliales intestinales selon (ii) un processus dépendant du recrutement des microtubules et des microfilaments, (iii) l'absence de facteurs d'invasion connus, et (iv) la capacité à survivre et se multiplier fortement au sein de larges vacuoles dans les macrophages sans induire de mort cellulaire (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). Depuis la définition du pathovar AIEC, d'autres propriétés de virulence de ces bactéries ont été mises en évidence, telles que leur capacité à moduler la composition du microbiote intestinal, à déstabiliser l'épithélium intestinal et à induire la formation de granulomes *in vitro*.

A l'heure actuelle, aucun outil moléculaire ne permet d'identifier le pathotype AIEC. Les techniques actuelles reposent sur un *screening* phénotypique des isolats, un processus particulièrement long. Une étude de génomique comparative a cependant pu mettre en évidence des SNP dans le génome des AIEC comparativement aux souches non AIEC, facilitant l'identification des AIEC avec une précision de 84 % (Camprubí-Font *et al.*, 2018). De plus, les souches AIEC présenteraient une prévalence plus importante du gène *pic*, impliqué dans la capacité d'invasion des souches, ainsi qu'une résistance plus importante à l'ampicilline comparativement aux souches non-AIEC (Camprubí-Font *et al.*, 2019). L'association de ces deux caractéristiques permettrait de classer les isolats d'*E. coli* selon leur phénotype avec une précision de 75,5 % (Camprubí-Font *et al.*, 2019). Les résultats de ces deux études ouvrent ainsi la voie à une caractérisation rapide du pathotype AIEC. Enfin, une méthode chimique basée sur l'utilisation de papier contenant des fibres de cellulose sur lesquelles sont greffés des résidus mannose permettraient de lier sélectivement le résidu FimH des AIEC et donc de détecter la présence des bactéries AIEC dans une suspension (Cauwel *et al.*, 2019).

II.1.2 Prévalence chez les patients atteints de MC

Selon les études, les souches AIEC associées à la muqueuse intestinale sont retrouvées chez 35 à 50 % des patients atteints de MC au niveau de la portion néotermale de l'iléon contre seulement 6 à 16 % des contrôles (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Martinez-Medina *et al.*, 2009a). Par conséquent, les individus sains peuvent être porteurs de souches AIEC sans pour autant

développer de MC. Les AIEC agissent en tant que « pathobiontes » dans la MC, c'est-à-dire des bactéries commensales ou pathogènes opportunistes ayant acquis des mutations patho-adaptatives, qui tirent avantage des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux particuliers pour entraîner la pathologie.

Certains génotypes d'*E. coli* sont plus fréquemment associés aux lésions iléales de la MC (Masseret *et al.*, 2001) et chaque patient pourrait porter plusieurs souches d'*E. coli* (Tyakht *et al.*, 2018). Plusieurs génomes de souches AIEC ont été séquencés et la comparaison de leurs séquences génomiques a révélé une population hétérogène avec une grande diversité génétique et un profil génomique semblable aux souches d'*E. coli* pathogènes extra-intestinales (ExPEC, *extraintestinal pathogenic E. coli*) (Smith *et al.*, 2013). La souche AIEC de référence LF82, isolée au niveau d'une lésion iléale chronique chez un patient atteint de MC, a plus particulièrement été étudiée (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998, 2004). Cette souche est phylogénétiquement proche des souches *E. coli* pathogènes aviaires (APEC-01, *avian pathogenic E. coli strain 01*), des souches *E. coli* associées aux méningites (NMEC S88, *meningitis-associated E. coli strain S88*) et des souches *E. coli* uropathogènes (UPEC UTI89, *uropathogenic E. coli strain UTI89*) (Miquel *et al.*, 2010).

II.2 Caractéristiques pathogènes des AIEC

II.2.1 Traversée de la couche de mucus

Les pathovars d'*E. coli* peuvent pénétrer la couche de mucus en sécrétant des protéases capables de dégrader ce mucus (McGuckin *et al.*, 2011). Une protéase sécrétée par les AIEC, la Vat-AIEC dégradant le mucus et notamment MUC2, contribue à la colonisation intestinale par les AIEC en modèle murin en favorisant la dissémination des bactéries au travers de la couche de mucus et l'adhésion des AIEC aux cellules épithéliales intestinales (Gibold *et al.*, 2016).

De nombreux pathogènes intestinaux résistent aux peptides antimicrobiens présents dans la couche de mucus grâce à des systèmes de modifications enzymatiques modifiant leur LPS ou à des protéases de membrane externe clivant les peptides antimicrobiens (Band and Weiss, 2014). La souche AIEC NRG857c possède un îlot génomique plasmidique (appelé PI-6) codant pour une protéase de membrane externe (ArlC) et une protéine de la famille Mig-14 (ArlA) lui conférant une résistance aux défensines et aux peptides cationiques à hélice α , des peptides antimicrobiens communément retrouvés au niveau intestinal (McPhee *et al.*, 2014).

II.2.2 Interaction des AIEC avec les cellules épithéliales intestinales

Une fois arrivées au niveau de la barrière épithéliale, les AIEC adhèrent fortement et colonisent les cellules épithéliales intestinales avant de les envahir et de rejoindre le compartiment sous-muqueux. Lors d'une inflammation intestinale, la barrière épithéliale est dérégulée et des

récepteurs spécifiques sont anormalement exprimés au niveau de cet épithélium, augmentant la pathogénèse des AIEC et la perméabilité intestinale (Smith *et al.*, 2013).

II.2.2.1 Adhésion aux cellules épithéliales intestinales

Les AIEC sont caractérisées par leur capacité à adhérer et envahir les cellules épithéliales intestinales mais également à coloniser l'intestin de souris génétiquement prédisposées et à induire une inflammation intestinale (Carvalho *et al.*, 2009; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). Le phénotype adhérent et invasif des AIEC est facilité par plusieurs structures retrouvées à la surface des bactéries. Par exemple, l'expression de domaines de liaison à la chitine à la surface des AIEC permet leur adhésion aux récepteurs chitinase-*like* de différentes lignées de cellules épithéliales intestinales humaines et de l'épithélium intestinal de modèle murin de colite induite au DSS (Low *et al.*, 2013). L'adhésion des AIEC à l'épithélium de l'hôte est également médiée par l'interaction entre les pili de type 1 (notamment l'adhésine FimH) exprimés à la surface des AIEC et le récepteur CEACAM (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules*) 6 porteur de résidus oligomannose et retrouvé au niveau de la bordure en brosse des entérocytes de l'iléon (Barnich *et al.*, 2007; Boudeau *et al.*, 2001). Grâce au séquençage du gène *fimH* de 45 souches AIEC et 47 souches non-AIEC isolées de patients atteints de MC et de contrôles, une corrélation entre certaines substitutions d'acides aminés et la capacité d'adhésion des souches aux cellules épithéliales intestinales a été observée (Dreux *et al.*, 2013). De plus, ces SNP dans le gène *fimH* sont importants pour la colonisation du tractus digestif et l'induction de l'inflammation dans un modèle murin transgénique CEABAC10 exprimant le récepteur humain CEACAM6 (Dreux *et al.*, 2013). Ces résultats révèlent un mécanisme d'évolution des AIEC ayant permis de sélectionner des mutations patho-adaptatives leur conférant une forte capacité d'adhésion à l'épithélium intestinal et une résistance à l'élimination *via* le péristaltisme intestinal (Dreux *et al.*, 2013). Le récepteur CEACAM6 est anormalement exprimé au niveau de la bordure en brosse des entérocytes de la muqueuse iléale lésée chez 35% des patients atteints de MC, ce qui n'est pas observé chez des sujets contrôles, favorisant la colonisation de la muqueuse iléale par les AIEC (Barnich *et al.*, 2007). Les AIEC peuvent également promouvoir leur propre colonisation de manière indirecte *via* l'activation des cytokines pro-inflammatoires augmentant l'expression du récepteur CEACAM6 par les cellules épithéliales intestinales de l'iléon (Barnich *et al.*, 2007) et du côlon (Mazzarella *et al.*, 2017), favorisant ainsi l'attachement et l'internalisation des AIEC. De plus, les cellules épithéliales intestinales en apoptose exposent à leur surface des récepteurs CEACAM6 fortement oligomannosylés, favorisant encore plus la colonisation par les AIEC (Dumych *et al.*, 2018).

Les flagelles, exprimés par les AIEC en présence d'acides biliaires ou de mucines (Sevrin *et al.*, 2018), permettent à ces bactéries de traverser la barrière protectrice de mucus pour atteindre

la surface de l'épithélium (Sevrin *et al.*, 2018) puis adhérer et envahir les cellules épithéliales (Barnich *et al.*, 2003; Sevrin *et al.*, 2018). En effet, le mutant isogénique de la souche AIEC LF82 délété du gène *fliC* codant la flagelline FliC n'est plus capable d'adhérer ni d'envahir les cellules épithéliales intestinales en culture (Barnich *et al.*, 2003) ni de rejoindre la surface de l'épithélium chez des souris monocolonisées (Sevrin *et al.*, 2018). D'autre part, ce mutant n'exprime plus que quelques pili de type 1 (Barnich *et al.*, 2003). Une expression induite des pili de type 1 chez le mutant isogénique LF82- Δ *fliC* par transformation avec un plasmide recombinant codant l'opéron *fim* ne restaure pas totalement les niveaux d'adhésion et d'invasion (Barnich *et al.*, 2003). Une étape de centrifugation permet de restaurer totalement l'adhésion mais pas l'invasion du mutant isogénique délété du gène *fliC* chez lequel une expression des pili de type 1 a été induite. L'absence de motilité ne permet donc pas d'expliquer à elle seule la diminution du pouvoir d'invasion observée. Les flagelles joueraient donc un rôle dans le processus d'invasion chez la souche AIEC LF82 en permettant sa motilité, mais également soit directement comme appareil de sécrétion pour des facteurs de virulence intervenant dans l'invasion comme déjà rapporté chez *Campylobacter* spp. (Guerry, 2007), soit indirectement en contrôlant l'expression de facteurs de virulence autres que les pili de type 1.

Les *long polar fimbriae* (LPF), dont le rôle a déjà été décrit chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Bäumler *et al.*, 1996), sont de longues structures filamenteuses présentes aux pôles de la bactérie. Ces fimbriae sont des adhésines indispensables à l'adhésion des bactéries aux cellules M des plaques de Peyer, qui serviraient de porte d'entrée alternative pour le passage des AIEC vers la *lamina propria*. Une étude menée *in vitro* sur des monocouches de cellules M humaines et *ex vivo* sur des plaques de Peyer humaines ou murines isolées a montré la capacité de la souche *E. coli* LF82 à adhérer à ces plaques *via* l'interaction des LPF (Chassaing *et al.*, 2011), dont l'expression est activée en présence de sels biliaires (Chassaing *et al.*, 2013), avec les glycoprotéines 2 exprimées au pôle apical des cellules M des plaques de Peyer isolées de souris *nod2*^{-/-} et de transloquer au travers d'une monocouche de cellules M (Chassaing *et al.*, 2011). La translocation des AIEC au travers de l'épithélium associé aux follicules est également dépendante du LPF bactérien et de l'expression de CEACAM6 par les cellules de cet épithélium (Keita *et al.*, 2019). De plus, les souches AIEC portant le gène codant le facteur GIPA (*growth in Peyer's patches*) portent également l'opéron *lpfA* (Vazeille *et al.*, 2016). La mutation du gène *gipA* abolit la capacité des souches AIEC à interagir avec les plaques de Peyer et à les envahir *in vitro* et *in vivo* en modèle murin CEACAC10, mais également à transloquer au travers de la barrière intestinale, ce qui se manifeste par une quantité diminuée de bactéries au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques (Vazeille *et al.*, 2016).

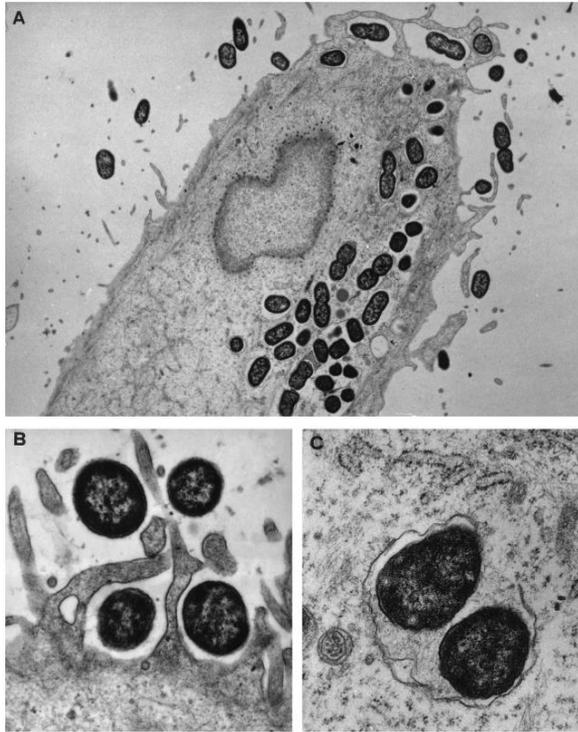


Figure 15 : Clichés de microscopie électronique à transmission de cellules épithéliales Hep-2 infectées par la souche *E. coli* LF82.

A. Adhésion et invasion de la souche *E. coli* LF82 à la cellule hôte (x 6200). **B.** Formation d'extensions membranaires par la cellule hôte infectée qui englobent les bactéries adhérentes en vue de leur internalisation (x 21 600). **C.** Lyse de la vacuole d'endocytose contenant les bactéries LF82 (x 28 800) (Boudeau *et al.*, 1999).

Enfin, les AIEC peuvent former des biofilms (Martinez-Medina *et al.*, 2009b). Cette capacité requiert le facteur bactérien σE codé par le gène *rpoE* (Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2013) et activé en réponse à différents stress interférant avec la production ou le repliement des protéines de membrane externe tels que la pression osmotique rencontrée dans le tractus gastro-intestinal (Rolhion *et al.*, 2007). Le facteur σE régule l'expression de gènes codant des enzymes périplasmiques participant au repliement des enzymes de l'enveloppe bactérienne, à la synthèse du LPS bactérien (Rezuchova *et al.*, 2003) et régule également l'expression de l'opéron *waaWVL* essentiel pour la formation de biofilms et la colonisation de la muqueuse intestinale par les AIEC (Chassaing *et al.*, 2015b).

II.2.2.2 Invasion des cellules épithéliales intestinales

Les bactéries AIEC sont capables d'envahir, de persister, et dans certains cas de se répliquer au sein des cellules épithéliales intestinales. Plusieurs souches AIEC expriment l'invasine IbeA, une protéine importante pour l'invasion des cellules Caco-2 et des cellules *M in vitro* (Cieza *et al.*, 2015). A l'heure actuelle, IbeA est la seule invasine identifiée chez les AIEC. La délétion d'IbeA diminue mais n'altère pas totalement la capacité des AIEC à envahir les cellules épithéliales intestinales, suggérant que les AIEC possèderaient d'autres invasines non caractérisées (Cieza *et al.*, 2015).

Une étude menée *in vitro* a permis de démontrer que le phénomène d'internalisation de la souche LF82 dans les cellules épithéliales intestinales telles que les cellules HEp-2 nécessite une polymérisation active d'actine et le recrutement des microtubules permettant l'émission d'élongations membranaires à la surface des cellules infectées, englobant alors les bactéries adhérentes (**Figure 15**) (Boudeau *et al.*, 1999). De telles modifications morphologiques ont également été observées lors de la macropinocytose induite par *Shigella* spp. ou *Salmonella* spp. en injectant des protéines effectrices dans les cellules hôtes *via* leur système de sécrétion de type III (T3SS) (Dunn and Valdivia, 2010). Cependant, l'analyse du génome de la souche *E. coli* LF82 n'a pas permis de mettre en évidence de déterminants génétiques d'invasion connus chez *Shigella* spp. ou chez d'autres pathovars d'*E. coli* (Boudeau *et al.*, 1999). Bien que ne possédant pas de T3SS, le génome de multiples souches AIEC code pour les composants de deux systèmes de sécrétion de type VI (T6SS) (Miquel *et al.*, 2010), une structure de surface permettant aux bactéries à Gram négatif de transloquer des protéines effectrices dans d'autres bactéries ou dans des cellules eucaryotes (Navarro-Garcia *et al.*, 2019). Décrit à l'origine pour son rôle dans la compétition inter-bactérienne, le T6SS est aujourd'hui reconnu pour avoir un large éventail de fonctions. Chez certaines bactéries, le T6SS est par exemple impliqué dans la diminution des réponses immunitaires de l'hôte, l'augmentation de la multiplication intracellulaire en macrophages ou encore l'interaction

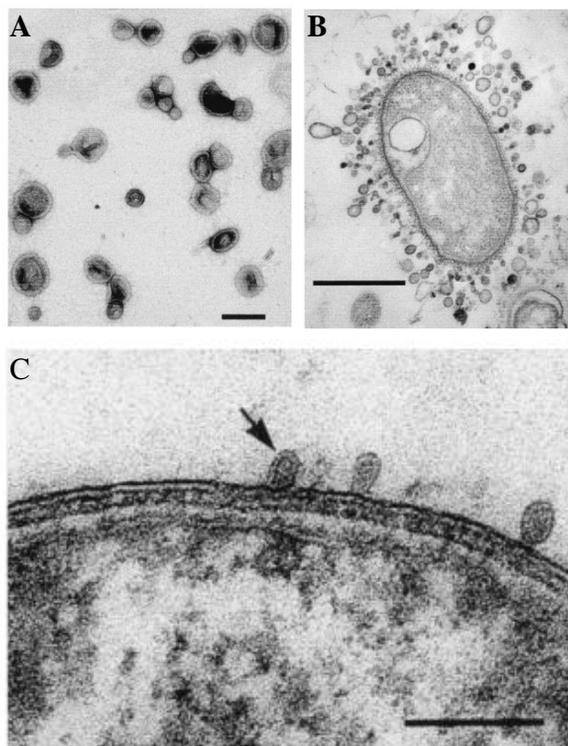


Figure 16 : Vésicules de membrane externe.

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

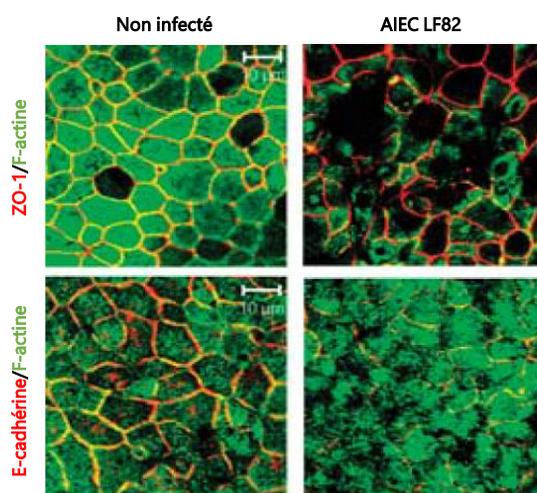


Figure 17 : Altération de la barrière épithéliale intestinale par la souche d'*E. coli* LF82.

L'infection de cellules Caco-2 différenciées par la souche de *E. coli* LF82 induit une déstabilisation des jonctions serrées visualisée par la redistribution des protéines ZO-1 (rouge) et E-cadhérine (rouge). Le cytosquelette d'actine apparaît en vert (modifiée d'après Sasaki *et al.*, 2007).

avec le système de microtubules de l'hôte afin de favoriser l'internalisation des bactéries dans les cellules hôtes (Navarro-Garcia *et al.*, 2019). La manière dont les T6SS contribuent à la pathogenèse des AIEC reste à déterminer, mais compte tenu de leurs rôles dans d'autres espèces, l'investigation de leur implication chez les AIEC est une piste intéressante. Bien que n'ayant pas mis en évidence le rôle exact de ces systèmes de sécrétion, une étude récente a montré qu'ils ne sont pas impliqués dans l'altération de la SUMOylation (une modification post-traductionnelle au cours de laquelle un polypeptide ubiquitine-like SUMO est attaché de manière covalente aux protéines) des protéines des cellules épithéliales intestinales induite par les AIEC afin d'inhiber l'autophagie et permettre leur survie intracellulaire (Dalmasso *et al.*, 2019).

De nombreuses bactéries à Gram négatif produisent des OMV leur permettant d'interagir avec des cellules eucaryotes ou d'autres cellules procaryotes (Jan, 2017). Ces vésicules, produites par bourgeonnement de la membrane externe à la surface des bactéries, sont constituées de LPS, de protéines de membrane externe et périsplasmiques et de phospholipides et peuvent véhiculer des adhésines, des toxines et des composés immunomodulateurs pouvant avoir un effet sur les cellules de l'hôte (Jan, 2017) (**Figure 16**). Comme la plupart des bactéries pathogènes (Horstman and Kuehn, 2002; Wai *et al.*, 1995), la souche AIEC LF82 produit des quantités plus importantes d'OMV qu'une souche d'*E. coli* K-12 non pathogène. Ces OMV contiennent la protéine bactérienne de membrane externe OmpA interagissant avec le récepteur cellulaire GP96 et permettent la délivrance de facteurs bactériens facilitant l'invasion des cellules réceptrices par les AIEC (Rolhion *et al.*, 2005, 2010). Ces OMV pourraient également participer à la survie des bactéries AIEC dans des compartiments endocytaires en délivrant des protéines bactériennes interférant avec la signalisation de la cellule hôte, mais si de tels effecteurs existent, ils restent à identifier.

II.2.2.3 Déstabilisation de la fonction de barrière par les AIEC

Des défauts de structure et de fonction des complexes apicaux de jonction ont été fréquemment observés chez les patients atteints de MC et en modèles murins de MICI (Landy *et al.*, 2016). Une diminution de la résistance électrique transépithéliale et de l'expression des protéines de jonctions serrées ZO-1 et E-cadhérine a été observée suite à l'infection d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales Caco-2 différenciées par des souches d'*E. coli* invasives isolées de patients atteints de MC et de RCH (Sasaki *et al.*, 2007) (**Figure 17**). De plus, une infection par la souche *E. coli* LF82 d'une monocouche de cellules épithéliales T84 ou MDCK-I diminue l'expression de ZO-1, altérant ainsi l'intégrité de cette monocouche (Wine *et al.*, 2009). Une expression augmentée de la protéine de jonction CLDN2 a également été observée dans des biopsies iléales de patients atteints de MC (Denizot *et al.*, 2012). Chez des souris transgéniques CEABAC10, l'infection par la souche *E. coli* LF82 altère l'intégrité de la muqueuse et augmente la

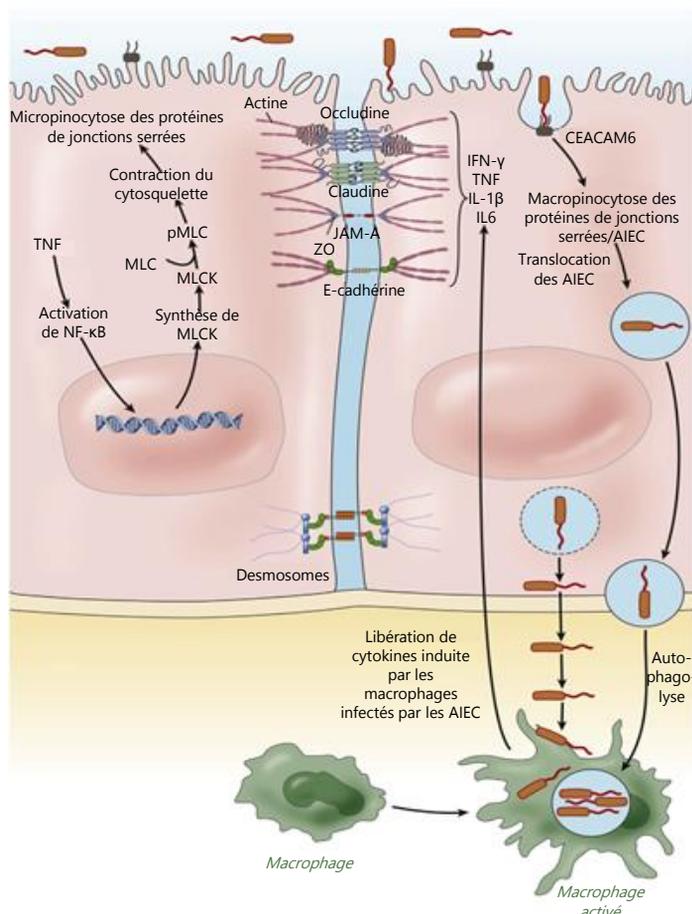


Figure 18 : Effets des AIEC sur les protéines de jonction majeures et voies régulatrices dans les cellules épithéliales.

L'internalisation indirecte des protéines de jonctions serrées par un processus de micropinocytose peut avoir lieu suite à l'activation de NFκB de manière dépendante du TNF-α, entraînant une augmentation de l'expression de MLCK et une contraction du cytosquelette. L'interaction des AIEC avec les cellules épithéliales intestinales résulte également en l'internalisation directe des protéines de jonctions serrées ou indirecte *via* l'activation des cytokines pro-inflammatoires. La perméabilité intestinale est alors compromise, permettant l'internalisation, la survie et la réplication des AIEC, mais également l'invasion des macrophages, exacerbant encore la perméabilité de la barrière. MLC, *myosin light chain* ; pMLC, MLC phosphorylée ; MLCK, *myosin light chain kinase*; JAM-A, junctional adhesion molecule-A (modifiée d'après Shawki et McCole, 2017).

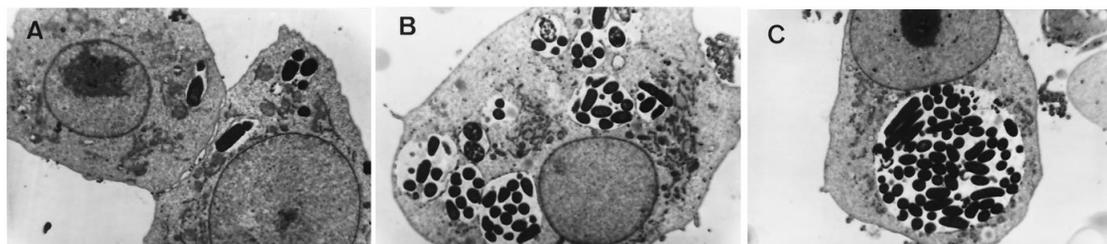


Figure 19 : Clichés de microscopie électronique à transmission de macrophages J774-A1 infectés par la souche *E. coli* LF82.

A. Après 1h d'infection, les bactéries LF82 sont internalisées dans un phagosome. **B.** Les bactéries LF82 sont capables de se multiplier, et à 8h post-infection des vacuoles contenant plusieurs bactéries sont observées. **C.** A 24h post-infection, les bactéries LF82 se trouvent dans une large et unique vacuole (x 7200) (modifiée d'après Glasser *et al.*, 2001).

perméabilité intestinale, des défauts corrélés à une expression anormale de la CLDN2 dans les entérocytes (Denizot *et al.*, 2012). Ainsi, les *E. coli* participeraient à l'augmentation de perméabilité observée chez les patients atteints de MC (**Figure 18**). Connaissant la capacité des souches d'*E. coli* à entraîner la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, il reste à définir si l'impact d'une infection sur la barrière intestinale constitue un effet direct des souches d'*E. coli* ou indirect *via* la sécrétion de certaines cytokines par les cellules infectées modulant l'expression et la localisation des protéines de jonction, et par conséquent la fonction barrière.

II.2.3 Interaction des AIEC avec les cellules immunitaires

Les souches AIEC isolées de patients atteints de MC sont capables, après phagocytose par les macrophages murins J774, de survivre et se multiplier fortement jusqu'à 48 h post-infection tout en résistant à l'activité bactéricide de ces cellules pendant au moins 5 jours et sans induire la mort des macrophages, ni par apoptose ni par nécrose (**Figure 19**). Cependant, les macrophages infectés sécrètent des taux élevés de TNF- α (Glasser *et al.*, 2001). La souche LF82 montre une plus forte capacité de multiplication en macrophages dérivés de monocytes de patients atteints de MC comparativement à des individus contrôles (Vazeille *et al.*, 2015).

Les bactéries AIEC peuvent résister à l'acidité du phagolysosome mais également aux fortes concentrations en espèces oxygénées réactives (ROS, *reactive oxygen species*) produites par les cellules lors de la réponse oxydative dirigée contre les pathogènes phagocytés (Tawfik *et al.*, 2014). Des gènes clés favorisent la survie et la réplication des AIEC en macrophages, notamment *htrA* codant pour une protéine de résistance à un stress induit par de fortes températures (Bringer *et al.*, 2005), *dsbA* codant pour une oxydoréductase (Bringer *et al.*, 2007), *hfq* codant pour une chaperonne à ARN importante pour l'adaptation des bactéries à un stress chimique (Simonsen *et al.*, 2011) et *gipA* codant pour un facteur leur permettant de coloniser les plaques de Peyer mais également de résister à l'acidité et au stress oxydatif au sein des macrophages (Vazeille *et al.*, 2016). L'expression de *gipA* est induite par certaines conditions intracellulaires gastro-intestinales (présence d'acides biliaires) et phagolysosomales (présence de ROS et pH acide). La délétion de *gipA* diminue fortement la réponse pro-inflammatoire et la réplication des AIEC au sein des macrophages (Vazeille *et al.*, 2016).

La présence de granulomes épithélioïdes constitués principalement de macrophages, de lymphocytes et de cellules géantes multinucléées représente l'une des caractéristiques histologiques de la MC. La détection d'antigènes et de l'ADN d'*E. coli* dans les granulomes de patients atteints de MC renforce l'hypothèse de l'implication d'*E. coli* dans la formation de ces structures (Liu *et al.*, 1995; Ryan *et al.*, 2004). *In vitro*, la souche LF82 induit la formation d'agrégats de macrophages humains infectés recrutant des lymphocytes « circulants » et contenant des cellules géantes

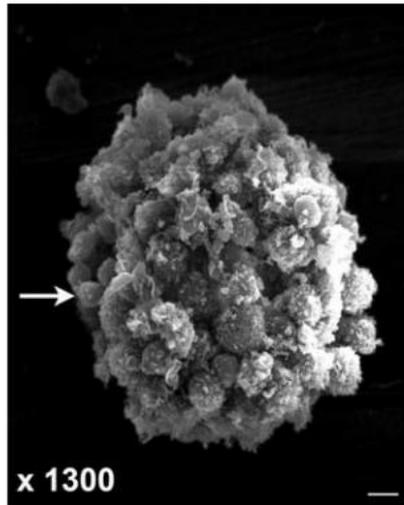


Figure 20 : Cliché de microscopie électronique à balayage d'une structure granulomateuse induite *in vitro* par la souche d'*E. coli* LF82.

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

multinucléées, ressemblant ainsi fortement aux granulomes associés à la MC (Meconi *et al.*, 2007) (**Figure 20**). Des extraits totaux de bactéries LF82 seuls induisent également la formation de ces agrégats, alors que ni des souches vivantes d'*E. coli* non pathogènes, ni des extraits totaux de ces souches n'induisent la formation d'agrégats, indiquant donc la présence d'antigènes spécifiques impliqués dans la formation des granulomes chez la souche LF82 (Meconi *et al.*, 2007).

La souche AIEC LF82 est également capable d'envahir et de se répliquer au sein des neutrophiles humains, mais contrairement à ce qui a été observé en macrophages et en cellules épithéliales intestinales, cette infection induit la mort de ces neutrophiles médiée par l'autophagie (Chargui *et al.*, 2012). En présence d'antibiotiques, les AIEC activent la production de ROS par les neutrophiles, contribuant ainsi à l'inflammation intestinale (Vong *et al.*, 2016).

II.2.4 Induction de la production de cytokines pro-inflammatoires par les AIEC

Plusieurs études menées *in vitro* et *in vivo* ont rapporté une induction des réponses pro-inflammatoires dans les cellules hôtes par les AIEC. L'infection de macrophages par la souche LF82 augmente la sécrétion de TNF- α , un phénomène essentiel pour la réplication intracellulaire de la bactérie (Bringer *et al.*, 2012). Une production accrue d'IL-8 par des cellules épithéliales intestinales infectées par la souche LF82 a également été rapportée. Dans un modèle de souris transgéniques CEABAC10, l'infection par la souche LF82 provoque une colite sévère accompagnée d'une augmentation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et IL-17 et d'une diminution de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Carvalho *et al.*, 2009). Chez des souris *il10*^{-/-}, l'infection par les AIEC entraîne la mise en place d'une inflammation chronique accompagnée d'une production d'IL-12 et d'IL-23 au niveau intestinal et de la production d'IFN- γ et d'IL-17 par les cellules T CD4⁺ (Schmitz *et al.*, 2019). Par ailleurs, l'IL-17 jouerait un rôle protecteur contre les AIEC en induisant la production d'IL-22 en modèle murin de colite induite au DSS (Zhang *et al.*, 2018b). Enfin, les AIEC pourraient diminuer le niveau du miARN let-7b dans les cellules épithéliales intestinales, entraînant une surexpression du récepteur TLR4 et favorisant ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Guo *et al.*, 2018b).

II.2.5 Modulation du microbiote intestinal par les AIEC

Il a été montré *in vivo*, chez des souris invalidées pour le gène *Tlr5* (*tlr5*^{-/-}) qui code pour le récepteur de la flagelline bactérienne, qu'une colonisation transitoire par les AIEC induit une inflammation chronique et une modification du microbiote intestinal vers un microbiote qui sécrète des niveaux supérieurs de LPS et de flagelline, et que ces effets durent longtemps après l'élimination des AIEC (Chassaing *et al.*, 2014). De plus, l'infection par les AIEC de souris génétiquement prédisposées et déficientes pour le gène codant le senseur d'acides aminés EIF2AK4 (*eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4*) aussi appelé GCN2 (*general control nonderepressible*

2) entraîne un défaut de l'élimination des AIEC par l'autophagie (Bretin *et al.*, 2016) et un changement de la composition du microbiote fécal conduisant à la mise en place d'une inflammation comparativement à des souris non infectées (Bretin *et al.*, 2018). Ces données suggèrent que chez un hôte génétiquement prédisposé, les AIEC peuvent induire une inflammation chronique en altérant la composition du microbiote intestinal. Une altération du microbiote intestinal a également été observée chez des souris CEABAC10 nourries avec un régime de type occidental riche en sucres et en graisses, avec notamment diminution des *Firmicutes* et une augmentation des *Proteobacteria* (Agus *et al.*, 2016). L'altération du microbiote à la suite de ce régime favorise l'émergence des bactéries *E. coli* associées à la muqueuse iléale, caecale et colique, mais également la colonisation par les bactéries AIEC associées à la MC (Agus *et al.*, 2016).

Enfin, les AIEC peuvent exacerber une dysbiose déjà présente chez l'hôte. En effet des souris traitées par antibiotiques puis infectées avec la souche AIEC LF82 présentent une dysbiose accrue associée à une augmentation des *Gammaproteobacteria* par rapport aux souris traitées uniquement par antibiotiques (Vong *et al.*, 2016). Chez le porc, l'induction chimique d'une colite par ingestion de gomme de carraghénane modifie le microbiote de ces animaux qui présente alors une diminution des *Bacteroidetes* et des *Firmicutes*. De plus, une infection par la souche AIEC UM146 suite à une colite induite par la carraghénane entraîne une nouvelle augmentation des *Bacteroidetes* par rapport au microbiote de porcs non infectés (Munyaka *et al.*, 2016). Enfin, en présence de sels biliaires, des voies métaboliques secondaires sont activées chez les AIEC et leur permettent d'utiliser l'éthanolamine comme source d'énergie, leur offrant un avantage compétitif sur les souches d'*E. coli* non-AIEC et favorisant ainsi leur colonisation, comme observé en modèle murin de colite (Delmas *et al.*, 2019).

II.2.6 Induction de la sécrétion d'exosomes à potentiel pro-inflammatoire et favorisant la réplication intracellulaire des AIEC par les cellules infectées

Les exosomes sont des vésicules membranaires de 30 à 100 nm de diamètre d'origine endosomale sécrétées par la majorité des types cellulaires suite à la fusion des endosomes multivésiculaires (EMV) avec la membrane plasmique (Théry *et al.*, 2009). Ils interviennent dans la communication cellule à cellule en transportant du matériel génétique et des protéines d'une cellule donneuse à une cellule réceptrice (McKelvey *et al.*, 2015). Les exosomes ont un rôle important dans les processus physiologiques et plus particulièrement dans la régulation immunologique en participant à la présentation des antigènes, à l'activation des cellules T mais aussi à la suppression immunologique (Carrière *et al.*, 2016a). L'infection par la souche AIEC LF82 induit une augmentation de la sécrétion d'exosomes capables d'activer la voie NF- κ B et la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires lorsqu'ils sont mis en contact avec des cellules

épithéliales intestinales ou macrophagiques naïves (Carrière *et al.*, 2016b). Les exosomes issus de cellules non infectées jouent un rôle dans les défenses de l'hôte, puisqu'ils peuvent limiter la réplication intracellulaire des AIEC, tandis que les exosomes issus de cellules infectées par des AIEC favorisent au contraire la réplication intracellulaire des AIEC, qui profiteraient ainsi des exosomes pour amplifier leur propre réplication au sein des cellules hôtes (Carrière *et al.*, 2016b).

II.3 Facteurs extrinsèques et intrinsèques à l'hôte modulant la réplication intracellulaire des AIEC

L'adhésion, l'invasion et la survie des AIEC en cellules épithéliales intestinales et en macrophages peuvent être favorisées par les facteurs environnementaux et génétiques de l'hôte. En modèle murin CEABAC10, l'administration d'un traitement au DSS induisant une colite (Carvalho *et al.*, 2008), d'antibiotiques (Drouet *et al.*, 2012) ou encore d'un régime riche en sucres et en graisses (Martinez-Medina *et al.*, 2014) favorise la colonisation par les AIEC, mettant en évidence le lien entre les facteurs environnementaux, génétiques et infectieux dans l'étiopathogénèse de la MC.

Certains facteurs de l'hôte protègent les cellules épithéliales de l'invasion par des bactéries. Le N-acétylglucosamine, un sucre présent dans le mucus, limite la formation de biofilms par la souche AIEC LF82 en interagissant avec le senseur bactérien NagC impliqué dans le contrôle de la production des fimbriae de type 1 (Sicard *et al.*, 2018). La méprine, une protéase pouvant être associée à la membrane des cellules ou sécrétée, dégrade quant à elle les fimbriae de type 1 des AIEC afin d'empêcher leur adhésion aux récepteurs humains et la colonisation de la muqueuse (Vazeille *et al.*, 2011). Cependant, une diminution de la méprine a été rapportée chez les patients atteints de MC et pourrait contribuer à la colonisation par les AIEC (Vazeille *et al.*, 2011).

La présence de SNP dans des gènes associés à l'autophagie tels que *NOD2*, *ATG16L1* ou *IRGM* chez les patients atteints de MC conduit à un défaut de reconnaissance et d'élimination des bactéries intracellulaires, entraînant la mise en place d'une inflammation (Lapaquette *et al.*, 2017). Suite à une infection bactérienne, le récepteur NOD2 est recruté à la membrane plasmique *via* son interaction avec les répétitions riches en leucine de la vimentine, un filament intermédiaire exprimé à la surface des cellules mésenchymateuses qui pourrait agir comme récepteur des AIEC (Henderson *et al.*, 2012). De plus, NOD2 interagit physiquement avec ATG16L1, permettant ainsi le recrutement de la machinerie autophagique au site d'entrée des bactéries (Travassos *et al.*, 2010). Cependant, chez les patients atteints de MC porteurs de variants spécifiques (L1007fs et R702W) dans le gène *NOD2*, la protéine NOD2 n'est pas capable d'interagir avec la vimentine mais reste localisée dans le cytosol (Stevens *et al.*, 2013) et ne permet pas de recruter la machinerie autophagique au site d'entrée de la bactérie, conduisant à un défaut d'élimination des bactéries

pathogènes (Travassos et al., 2010). En effet, suite à une infection par les AIEC et comparativement aux macrophages sauvages, les macrophages déficients pour *Nod2* présentent une diminution de l'activation de l'autophagie associée à une augmentation de la réplication intracellulaire des AIEC (Lapaquette et al., 2012). De même, l'expression du variant *ATG16L1*^{T300A} associé à un risque accru de développer la MC altère la capacité des cellules épithéliales HeLa à contrôler la réplication intracellulaire des AIEC (Lapaquette et al., 2010). Le variant de risque *IRGM*^{C313T} associé à la MC entraîne une perte de contrôle de l'expression d'IRGM par le miR-196, avec par conséquent une xénophagie défectueuse et une réplication intracellulaire anormale des AIEC (Brest et al., 2011).

II.4 Stratégies thérapeutiques ciblant les AIEC

Des molécules couramment utilisées dans le cadre du traitement de la MC pourraient limiter la capacité des AIEC à envahir les cellules hôtes. En effet, une étude menée *ex vivo* sur des biopsies de patients a montré que l'Infliximab permet de restaurer une barrière épithéliale efficace contre les AIEC en bloquant les radeaux lipidiques (Yakymenko et al., 2018). Les mercaptopurines diminuent l'interaction des AIEC avec les cellules épithéliales intestinales et les macrophages *in vitro* en affectant la capacité des AIEC à former des biofilms, à produire de la cellulose et en réduisant leur motilité (Migliore et al., 2018). Parmi les 6-mercaptopurines, l'azathioprine permet d'induire l'autophagie. Cette induction a été corrélée à une augmentation de la clairance des AIEC et une diminution de l'induction de la sécrétion de TNF- α par ces bactéries. De plus, la présence du variant à risque *ATG16L1*^{T300A} n'atténue pas l'induction de l'autophagie par l'azathioprine (Hooper et al., 2019).

Ces dernières années de nombreuses études ont été menées pour développer de nouveaux outils thérapeutiques ciblant les AIEC et l'une des premières options thérapeutiques étudiées fut l'utilisation d'antibiotiques. Hormis la rifaximine, qui diminue *in vitro* l'expression des gènes de virulence et la motilité des AIEC sensibles à cette molécule, leur capacité d'adhésion et d'invasion en cellules épithéliales intestinales, mais également la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induite par ces bactéries (Dogan et al., 2018), l'utilisation d'antibiotiques pour traiter la MC s'est révélée peu efficace avec de nombreux effets secondaires tels qu'une diminution très importante de la diversité du microbiote intestinal et le développement de souches pathogènes (Nitzan et al., 2016). Pour pallier à ces problèmes, de nouveaux outils thérapeutiques ont été développés, tels que les bactériophages, des virus infectant les bactéries de façon très spécifique et induisant donc moins d'effets secondaires qu'une antibiothérapie. L'utilisation d'un cocktail de trois bactériophages dirigés contre la souche AIEC LF82 diminue la colonisation de cette souche et la réponse inflammatoire de l'hôte en modèle murin (Galtier et al., 2017).

Certains composants alimentaires pourraient limiter l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales intestinales par les AIEC, notamment les fibres végétales qui peuvent réduire l'adhésion des *E. coli* aux cellules épithéliales intestinales (Martin *et al.*, 2004) et la lactoferrine présente dans le lait qui limite l'adhésion et la survie intracellulaire des AIEC et possède une activité antimicrobienne et/ou anti-inflammatoire (Bertuccini *et al.*, 2014; Frioni *et al.*, 2014). De plus, l'huile de Krill, un crustacé, permettait de diminuer l'inflammation intestinale en améliorant l'intégrité de la barrière et de limiter l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales par les AIEC et la survie de ces bactéries en macrophages *in vitro* (Costanzo *et al.*, 2016). Même si la majorité des essais cliniques impliquant l'usage de probiotiques pour le traitement de la MC se sont révélés décevants, leur utilisation pour inhiber de façon spécifique l'adhésion des AIEC pourrait être une option thérapeutique intéressante. En effet, certaines souches probiotiques telles que *E. coli* Nissle 1917 (Boudeau *et al.*, 2003) ou *Saccharomyces cerevisiae* (Sivignon *et al.*, 2015a) peuvent inhiber l'adhésion des AIEC aux cellules épithéliales intestinales. Notamment, la souche *S. cerevisiae* prévient la colonisation des AIEC en inhibant la liaison FimH-CEACAM6 (Sivignon *et al.*, 2015a). Cette découverte a permis le développement de molécules dites anti-FimH telles que les thiazolylmannosides (TazMans), parvenant à limiter la colonisation des AIEC *in vivo* et la réponse inflammatoire de l'hôte (Chalopin *et al.*, 2016; Sivignon *et al.*, 2015b).

Le rôle de l'autophagie dans le contrôle de la multiplication des AIEC dans les cellules hôtes a été démontré (Lapaquette *et al.*, 2010, 2012). Ainsi, la modulation de ce processus pourrait permettre le développement de nouveaux outils thérapeutiques pour cibler les AIEC, un sujet développé dans la partie III.5.7 de ce manuscrit.

III. L'autophagie

III.1 Généralités

La première utilisation du terme « autophagie » remonte aux années 1860, mais c'est en 1963 que Christian de Duve utilisa ce terme sous sa définition actuelle pour désigner le processus cellulaire par lequel le matériel intracellulaire est délivré au lysosome pour être dégradé. L'identification des gènes liés à l'autophagie (*ATG*) chez la levure au début des années 1990 a permis à Yoshinori Ohsumi de recevoir le prix Nobel de physiologie et médecine en 2016 (Kirkin, 2019; Tsukada and Ohsumi, 1993).

Trois types d'autophagie ont été décrites chez les mammifères : la micro-autophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA, *chaperone-mediated autophagy*) et la macro-autophagie (Galluzzi *et al.*, 2017). Au cours de la micro-autophagie, les substrats intracellulaires sont capturés à partir du cytoplasme *via* la protrusion ou l'invagination des membranes lysosomales. Au cours de la CMA, des protéines chaperonnes telles que la protéine HSC70 (*heat shock cognate*

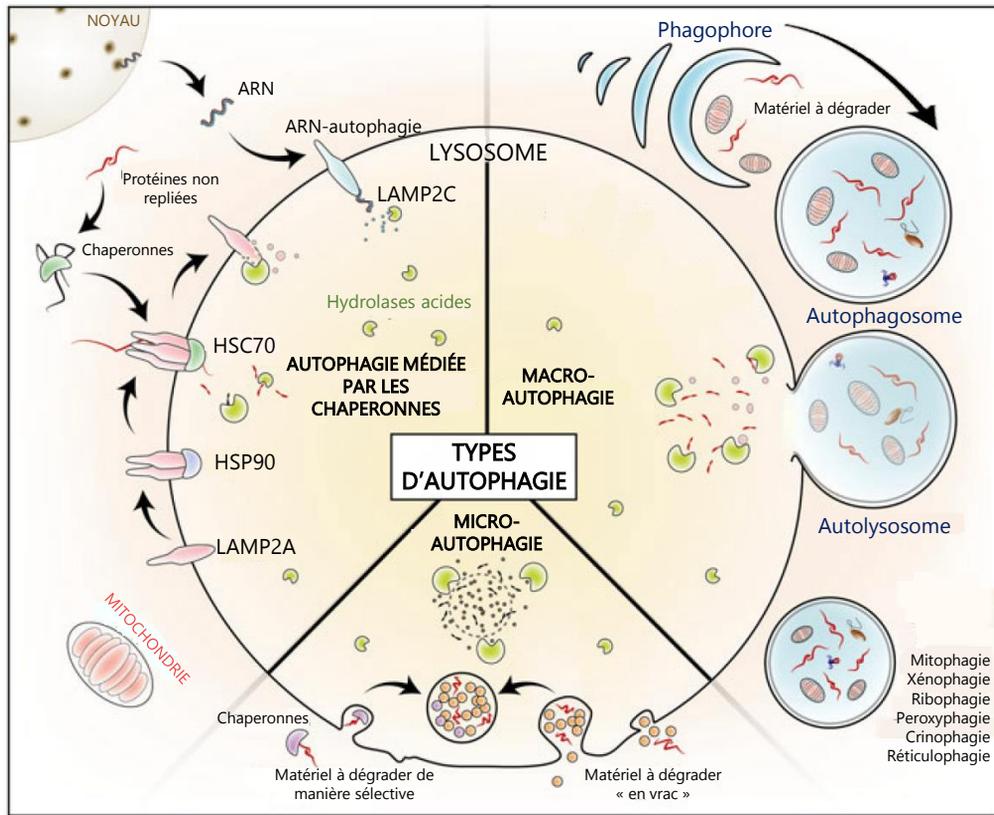


Figure 21 : Trois types d'autophagie présents dans les cellules mammifères.

Trois types d'autophagie sont retrouvés dans les cellules mammifères : l'autophagie médiée par les chaperonnes, la macro-autophagie et la micro-autophagie. L'autophagie médiée par les chaperonnes implique la reconnaissance des substrats autophagiques tels que les protéines mal repliées par des protéines de la famille des HSP. Cette étape est suivie de la translocation du cargo autophagique au travers de la membrane du lysosome de manière dépendante de LAMP2A. Les ARN peuvent être également dégradés par translocation *via* la protéine LAMP2C. Au cours de la micro-autophagie, le cargo est capturé par invagination directe de la membrane du lysosome. Enfin, au cours de la macro-autophagie, les composants cytoplasmiques sont progressivement capturés par une double membrane appelée autophagosome. Après fermeture, les autophagosomes matures peuvent fusionner avec le lysosome pour former l'autolysosome. Plusieurs types de composants cytoplasmiques peuvent être capturés par la macro-autophagie et le processus prend alors le nom spécifique correspondant au matériel dégradé (mitochondrie/mitophagie, ribosome/ribophagie, pathogène/xénophagie, peroxyosome/ peroxyphagie, granule de sécrétion/crinophagie, réticulum endoplasmique/réticulophagie) (modifiée d'après González-Polo *et al.*, 2016).

71 kDa protein) reconnaissent sélectivement les substrats cibles contenant un motif consensus unique, « KFREQ », et déclenchent leur linéarisation en vue d'être adressés au lysosome *via* le récepteur membranaire lysosomal spécifique (LAMP2A, *lysosome-associated membrane protein type 2A*). Enfin, au cours de la macro-autophagie, une membrane d'isolation séquestre une petite portion du cytoplasme pouvant contenir du matériel soluble et des organelles pour former un autophagosome qui fusionnera avec un lysosome (**Figure 21**). Ces trois types d'autophagie se terminent par la dégradation du matériel capturé dans le lysosome et le recyclage des produits de dégradation (Galluzzi *et al.*, 2017). Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons plus spécifiquement à la macro-autophagie, décrite en détails dans la partie suivante.

III.2 Mécanisme moléculaire de la macro-autophagie

La macro-autophagie, appelée autophagie dans la suite de ce manuscrit, peut être subdivisée en 3 étapes séquentielles : (i) l'initiation durant laquelle se forme la membrane d'isolation, (ii) l'élongation de la membrane et (iii) la maturation de l'autophagosome et la dégradation de son contenu par le lysosome (Yin *et al.*, 2016) (**Figure 22**).

III.2.1 L'initiation

Recrutement des complexes ULK et Beclin 1 : L'initiation de l'autophagie nécessite l'activité du complexe ULK (*UNC-51-like-kinase*), composé des protéines ULK1, FIP200 (focal adhesion kinase [*FAK*] *family kinase-interacting protein of 200 kDa*) et ATG13 (Ganley *et al.*, 2009). Les signaux activateurs de l'autophagie entraînent la déphosphorylation d'ULK1, qui peut alors phosphoryler ATG13 et FIP200. Ceci active le complexe ULK, qui rejoindrait alors la membrane du RE (Karanasios *et al.*, 2013) en interagissant avec les protéines transmembranaires VMP1 (*vacuole membrane protein 1*) situées dans la membrane du RE. Cette interaction serait à l'origine de la formation du phagophore (Koyama-Honda *et al.*, 2013) (**Figure 23**). La relocalisation de ULK1 à la membrane du RE permet le recrutement du complexe PI3K de classe III, plus communément appelé complexe Beclin 1 et composé des protéines Beclin 1 (BECN1), VPS34 (*vacuolar protein sorting protein 34*, aussi appelée PIK3C3 [*phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3*] chez l'Homme) et ATG14. Le recrutement de ce complexe par ULK1 vers le RE est dépendant de son interaction avec la protéine d'assemblage pro-autophagique AMBRA1 (*autophagy and Beclin 1 regulator 1*) phosphorylée par ULK1 (Di Bartolomeo *et al.*, 2010). Au niveau de la membrane du RE, la protéine BECN1 interagit également avec VMP1 (Molejon *et al.*, 2013) (**Figure 23**).

Formation de l'omégasome : La phosphorylation de BECN1 par ULK1 active la protéine VPS34 (Russell *et al.*, 2013), permettant ainsi la production de PI(3)P (phosphatidylinositol-3-phosphate) essentiel à la formation des autophagosomes (**Figure 23**). Dans la membrane en

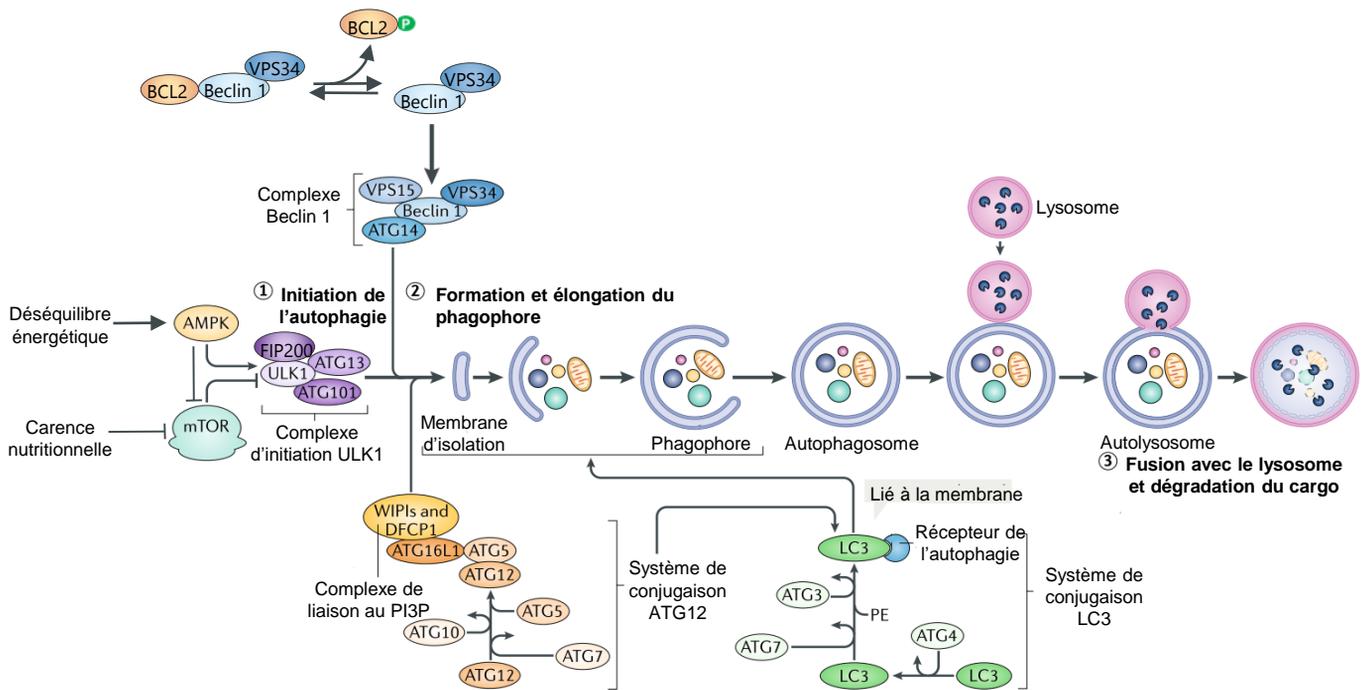


Figure 22 : Le processus macro-autophagique.

L'initiation de l'autophagie (1) requiert l'assemblage de diverses protéines en plusieurs complexes : le complexe ULK1, dont l'assemblage est régulé par mTOR (inhibiteur) et AMPK (activateur), le complexe Beclin 1 nécessitant la libération de la Beclin 1 suite à la phosphorylation de BCL2, et le complexe de liaison au PI3P, gouvernant la distribution de la machinerie permettant la formation de l'autophagosome. La formation et l'élongation du phagophore (2) requiert l'intervention des systèmes de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1 et LC3. Dans le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1, ATG12 se lie à ATG5 qui est alors attachée à ATG16L1. Ce complexe se dimérise puis interagit avec le complexe de liaison au PI(3)P formé par les protéines WIPI et DFCP1. Le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 favorise alors la conjugaison de LC3 après que LC3 ait été clivée en LC3-I et conjuguée avec une phosphatidylethanolamine pour former LC3-II. Ce conjugué est alors incorporé dans les membranes pré-autophagosomales et autophagosomales et peut alors interagir avec les récepteurs de l'autophagie. Le phagophore mature ensuite en autophagosome puis fusionne avec un lysosome (3) pour former l'autolysosome dans lequel le cargo séquestré sera dégradé (modifiée d'après Hansen *et al.*, 2018).

formation, ces domaines enrichis en PI(3)P permettent la naissance d'une structure appelée omégasome (Ktistakis *et al.*, 2011) (**Figure 23**). Le modèle actuel propose que la membrane isolée appelée phagophore et qui formera l'autophagosome émane des domaines lipidiques enrichis en PI(3)P qui constituent l'omégasome. Cependant, la source intracellulaire de cette membrane reste incertaine. Celle-ci pourrait provenir de membranes recyclées issues du RE, des mitochondries, de l'appareil de Golgi, de la membrane plasmique ou encore des endosomes, et son origine dépendrait probablement du type cellulaire ainsi que des conditions physiologiques et de croissance de la cellule (Wei *et al.*, 2018).

Recrutement de la machinerie d'élongation : Le phagophore enrichi en PI(3)P est reconnu par le complexe WIPI (*WD repeat protein interacting with phosphoinositides*) constitué des protéines WIPI capables de lier les PI(3)P. Les WIPI (WIPI 1, 2, 3 et 4) permettent de faire le lien entre la production de PI(3)P et la lipidation de la protéine MAP1LC3/LC3 (*microtubule-associated protein 1-light chain 3/light chain 3*), une étape cruciale pour l'élongation du phagophore. En effet, WIPI2 permet le recrutement du complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 (**Figure 23**) et WIPI1 est essentielle pour la lipidation de LC3. WIPI4 interagit avec ATG2 et cette interaction est également importante pour la lipidation de LC3 mais reste encore mal caractérisée. Enfin, la fonction de WIPI3 reste à identifier (Proikas-Cezanne *et al.*, 2015).

Le complexe ATG9 participe aussi à la biogenèse des membranes autophagosomales. Pendant l'induction de l'autophagie, la protéine ATG9, une protéine transmembranaire, est transportée de l'appareil de Golgi aux endosomes tardifs puis aux membranes des autophagosomes (Takahashi *et al.*, 2011). Ce trafic pourrait permettre de fournir à la structure pré-autophagosomale des facteurs importants pour la formation des autophagosomes ou des composants lipidiques provenant des différents compartiments cellulaires (Mizushima *et al.*, 2011).

III.2.2 L'élongation

L'élongation permet la capture des composants par le phagophore, dont l'expansion est assurée par l'apport de lipides mais aussi par le recrutement et l'activité de deux complexes de conjugaison, ATG12-ATG5-ATG16L1 et LC3/GABARAP (*gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*) (Nakatogawa, 2013) (**Figure 22**).

Le système de conjugaison ATG12-ATG5 est formé tout d'abord par l'activation d'ATG12 par ATG7 de manière ATP-dépendante (Tanida *et al.*, 1999), entraînant le transfert d'ATG12 vers ATG10. ATG12 se lie alors de manière covalente à la protéine ATG5 afin de former le conjugué ATG12-ATG5, libérant ainsi ATG10 (Mizushima *et al.*, 1998). La protéine ATG16L1 s'associe ensuite de manière non covalente à ce conjugué pour former un complexe macromoléculaire ATG12-ATG5-ATG16L1 qui se situe au niveau de la membrane externe du

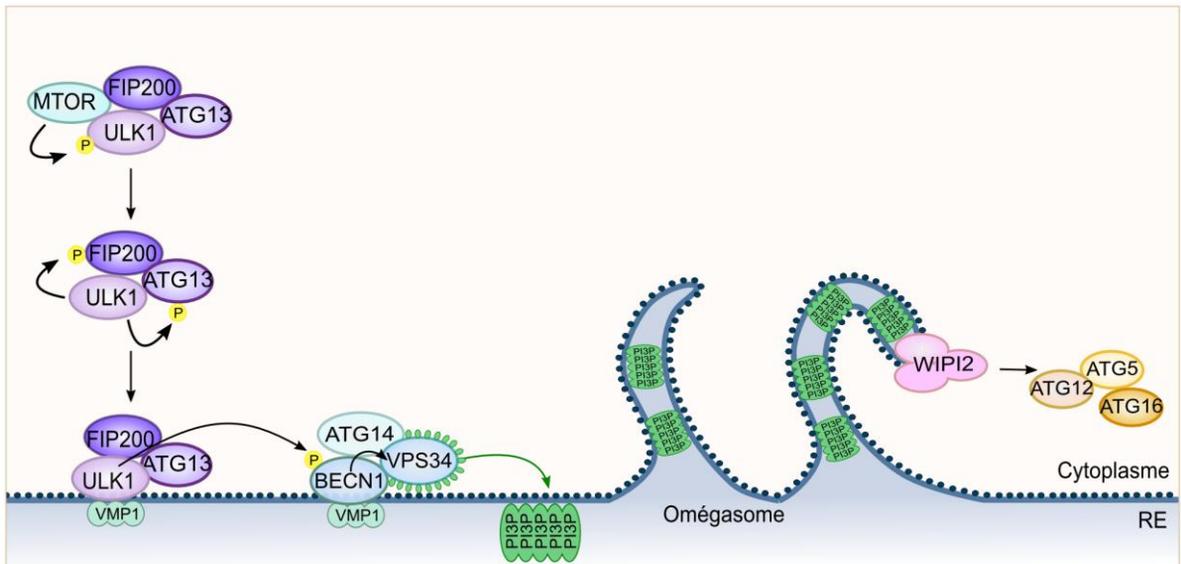


Figure 23 : L’initiation de la formation des autophagosomes.

Une fois activé, le complexe ULK1 est recruté sur la membrane du RE grâce à l’interaction de la protéine ULK1 avec les protéines VMP1 présentes dans la membrane du RE. Le complexe Beclin 1 est alors recruté sur la membrane du RE. La phosphorylation de la protéine BECN1 par ULK1 induit l’activation de la protéine VPS34 permettant la production de PI(3)P dans la membrane du RE. La synthèse de PI(3)P initie la formation de l’omégasome sur lequel sera recruté le complexe WIPI2 qui recrutera à son tour le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 nécessaire à l’élargissement de l’autophagosome.

phagophore et se dissocie dès la fermeture de ce dernier (Mizushima *et al.*, 2003). Ce complexe est essentiel au processus autophagique, toutefois une autophagie indépendante des protéines ATG5 et ATG7 a été décrite *in vitro* en réponse à des stress particuliers tels qu'une exposition des cellules à une molécule génotoxique, l'étoposide, et *in vivo* lors de la dégradation des mitochondries pendant la maturation des érythrocytes au cours de l'embryogenèse murine (Nishida *et al.*, 2009).

Le système de conjugaison LC3/GABARAP : Il existe deux familles de protéines capables d'être lipidées, LC3 (comprenant LC3A, B, B2 et C) et GABARAP (comprenant GABARAP, -L1, -L2). Toutes ces protéines sont lipidées selon le même principe impliquant les systèmes de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1 et LC3/GABARAP (Nath *et al.*, 2014). Pour simplifier la lecture, ces protéines seront regroupées sous le terme LC3 pour le reste de ce manuscrit. La protéine LC3 non mature, appelée pro-LC3 est clivée par la protéase ATG4 et donne la forme cytosolique LC3-I pouvant être activée par ATG7 puis transférée à ATG3 avant d'être liée de manière covalente à un phospholipide membranaire, le PE afin de former le complexe LC3-PE ou LC3-II (Kabeya, 2000). Bien que le substrat principal d'ATG12 soit ATG5, ATG12 peut également s'associer à ATG3 pour permettre la lipidation de LC3 (Radoshevich *et al.*, 2010). Contrairement au complexe ATG12-ATG5-ATG16L1, la forme LC3-II est présente aussi bien au niveau des membranes externes que des membranes internes du phagophore et est primordiale dans les dernières étapes de la formation du phagophore fermé (ou autophagosome) (Kabeya, 2000). Tandis que le LC3-II associé à la membrane externe pourra être délipidé et recyclé au cours de la maturation, la forme LC3-II associée à la membrane interne du phagophore ne sera pas dissociée et sera donc dégradée lors de sa fusion avec les lysosomes (Yu *et al.*, 2012). Ces caractéristiques font de LC3-II un marqueur de choix pour l'étude de l'autophagie (Klionsky *et al.*, 2016). Le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1, en augmentant l'activité d'ATG3, participe à l'étape de lipidation de LC3 (Hanada *et al.*, 2007; Lystad *et al.*, 2019).

III.2.3 La maturation et la dégradation du contenu par le lysosome

L'élongation des extrémités du phagophore conduit à sa fermeture pour donner un autophagosome d'environ 0,5 à 1,5 μm de diamètre (Mizushima *et al.*, 2002). La maturation de l'autophagosome requiert l'activité d'ATG4 pour dissocier le complexe LC3-II de la surface externe de l'autophagosome et éviter l'accumulation d'autophagosomes incomplets et non fermés dans la cellule (Yu *et al.*, 2012). Le mécanisme impliqué dans la fermeture du phagophore s'apparenterait à une scission membranaire puisque les faces externe et interne de la double-membrane ne sont pas en contact lors de la fermeture (Knorr *et al.*, 2015). Une fois fermé, l'autophagosome peut fusionner directement avec le lysosome pour donner un autolysosome ou bien fusionner séquentiellement avec un endosome pour donner une vacuole intermédiaire appelée

amphisome qui fusionne alors avec le lysosome pour former l'autolysosome. Ces événements conduisent à l'acidification de la vacuole et à la dégradation du contenu intra-luminal et de la membrane interne par les enzymes lysosomales (Zhao and Zhang, 2019). Ces produits de dégradation seront ensuite libérés dans le cytosol, grâce à des transporteurs lysosomaux et recyclés par la cellule (Tong *et al.*, 2010). Une réactivation de la protéine kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*), régulateur négatif majeur de l'autophagie, permettrait de recycler les lysosomes engagés dans la maturation de l'autophagosome (Yu *et al.*, 2010).

III.3 Régulation du processus macro-autophagique

III.3.1 L'induction de l'autophagie par les complexes protéiques

L'autophagie est régulée par l'intégration d'un ensemble complexe de signaux activateurs et inhibiteurs. Les plus influents sont les signaux associés aux niveaux de nutriments disponibles mais d'autres signaux peuvent réguler ce processus, tel que le niveau de ROS. Ces signaux sont intégrés par des régulateurs tels que le complexe mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*), le complexe AMPK (*adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase*), ou encore les membres de la famille BCL (*B-cell lymphoma*)-2/BCL-X_L (Galluzzi *et al.*, 2014) (**Figure 22**).

Le complexe mTORC1 : Le complexe mTORC1 est un complexe kinase composé de 5 sous-unités dont mTOR et RAPTOR (*regulatory-associated protein of mTOR*). Ce complexe est constitutivement actif et recruté à la membrane du lysosome par les Rag GTPases en condition nutritionnelle normale (Sancak *et al.*, 2008). La présence et l'activité des Rag GTPases à la membrane du lysosome sont contrôlées par le complexe RAGULATOR activé par l'accumulation d'acides aminés dans le lysosome en conditions normales (Sancak *et al.*, 2010). Lorsqu'il est activé et recruté à la membrane du lysosome, mTORC1 phosphoryle ULK1, inhibant son activité et donc l'autophagie (Kim *et al.*, 2011a). Lors d'une carence en nutriments, le niveau d'acides aminés dans les lysosomes diminue, diminuant ainsi l'activité de RAGULATOR et des Rag GTPases. Le complexe mTORC1 n'est plus recruté à la membrane du lysosome et reste inactif, la phosphorylation d'ULK1 diminue et déclenche l'induction de l'autophagie. D'autres signaux peuvent agir au niveau de mTORC1 et notamment le stress du réticulum, induisant ainsi l'autophagie (Fazlul Kabir *et al.*, 2019).

Les protéines de la famille BCL-2/BCL-X_L modulent l'association de BECN1 avec les autres composants de son complexe. Lorsque les nutriments sont abondants, BECN1 forme un complexe avec BCL-2, ce qui perturbe l'interaction de BECN1 avec VPS34 et inhibe donc l'activité PI(3)K du complexe BECN1. A l'inverse, lors d'une carence nutritionnelle, la phosphorylation de BCL-2/BCL-X_L par la kinase JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (Wei *et al.*, 2008) ou la

Tableau 7 : Facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'autophagie.

+ : effet activateur du facteur de transcription sur l'autophagie, - effet inhibiteur du facteur de transcription sur l'autophagie. Modifié d'après Feng *et al.*, 2015.

Facteur de transcription	Gène cible	Effet	Référence
ATF4	<i>ATG5, LC3, ULK1</i>	+	Milani <i>et al.</i> , 2009
ATF5	<i>MTOR</i>	-	Sheng <i>et al.</i> , 2011
CEBPB	<i>BNIP3, LC3, ULK1</i>	+	Ma <i>et al.</i> , 2011
DDIT3/CHOP	<i>ATG5, LC3</i>	+	Rouschop <i>et al.</i> , 2010
E2F1	<i>ATG5, BNIP3, LC3, ULK1</i>	+	Polager <i>et al.</i> , 2008
FOXO1	<i>ATG5, ATG12, ATG14, BECN1, BNIP3, LC3, PIK3C3/VPS34</i>	+	Shaw <i>et al.</i> , 2008
FOXO3	<i>ATG4, ATG12, BECN1, BNIP3, LC3, ULK1, ULK2, PIK3C3/VPS34</i>	+	Zhao <i>et al.</i> , 2007
GATA1	<i>LC3</i>	+	Kang <i>et al.</i> , 2012
JUN	<i>BECN1, LC3</i>	+	Jia <i>et al.</i> , 2006
NFKB	<i>BCL2, BECN1, BNIP3</i>	+ ou -	Shaw <i>et al.</i> , 2008
TP53	<i>ATG2, ATG4, ATG7, ATG10, BCL2, ULK1</i>	Cytosol - ; nucleus +	Kenzelmann Broz <i>et al.</i> , 2013
SOX2	<i>ATG10</i>	+	Rosenbluth and Pietsenpol, 2009
SREBF2/SREBP2	<i>ATG4, LC3</i>	+	Seo <i>et al.</i> , 2011
STAT1	<i>ATG12, BECN1</i>	-	McCormick <i>et al.</i> , 2012
STAT3	<i>ATG3, BCL2, BNIP3, BECN1, PIK3C3, HIF1A</i>	+ ou -	Dauer <i>et al.</i> , 2005
TFEB	<i>ATG4, ATG9, BCL2, LC3, WIPI</i>	+	Palmieri <i>et al.</i> , 2011
ZKSCAN3	<i>LC3, ULK1, WIPI</i>	-	Moresi <i>et al.</i> , 2012

phosphorylation de BECN1 par ULK1 (Russell *et al.*, 2013) ou DAPK (*death associated protein kinase*), un régulateur positif de l'apoptose, entraîne la libération de BECN1 (Zalckvar *et al.*, 2009).

Le complexe AMPK : Un déséquilibre entre la production et la dépense d'énergie est détecté par AMPK et permet son activation. Lorsque le niveau d'AMP est faible dans la cellule, AMPK régule négativement mTORC1 pour stopper la répression de l'autophagie, soit par une phosphorylation directe de la sous-unité RAPTOR du complexe mTORC1 (Gwinn *et al.*, 2008), soit de manière indirecte *via* la phosphorylation de TSC (*tuberous sclerosis complex*), un complexe réprimant mTORC1 (Inoki *et al.*, 2003). Lors d'une diminution du niveau de glucose dans la cellule, AMPK peut phosphoryler et activer directement le complexe ULK (Kim *et al.*, 2011a), activant alors le complexe PI(3)K. Au final, la détection d'une diminution du niveau d'énergie intracellulaire conduit à l'induction de l'autophagie.

III.3.2 Régulation transcriptionnelle

De nombreux facteurs de transcription, induits suite à stress tel qu'une carence en nutriments vont se fixer sur les promoteurs des gènes de l'autophagie et ainsi réguler l'expression de ces gènes (Feng *et al.*, 2015) (**Tableau 7**).

Facteurs de transcription activant l'autophagie : Plusieurs facteurs de transcription peuvent activer l'autophagie. En réponse aux facteurs de croissance et à la stimulation par l'insuline, les protéines FOXO3 (*forkhead box O 3*) sont inhibées par phosphorylation par AKT/PKB (protéine kinase B). Lorsque AKT est réprimée, les protéines FOXO3 transloquent au noyau où elles activent l'expression des gènes impliqués dans l'initiation de l'autophagie (Zhao *et al.*, 2007). L'autophagie est également activée par le facteur TFEB (*transcription factor EB*) lors d'une carence en nutriments. Lorsqu'il est phosphorylé par la kinase MAPK1/ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase 2*) sur sa sérine 142 ou par mTORC1 sur ses sérines 142 et 211 ou par PKC β (protéine kinase C β), TFEB est retenu dans le cytosol. Lors d'une carence en nutriments, TFEB est déphosphorylé et peut transloquer au noyau *in vitro* et *in vivo* (Chen *et al.*, 2017; Settembre *et al.*, 2011), activant la transcription de gènes impliqués dans l'initiation de l'autophagie, l'élongation de la membrane de l'autophagosome, la capture du substrat mais aussi le trafic des autophagosome et leur fusion avec les lysosomes, augmentant ainsi le flux autophagique (Palmieri *et al.*, 2011; Settembre *et al.*, 2011). Un autre facteur de transcription impliqué dans l'induction de l'autophagie est le facteur ATF (*activating transcription factor*) 4 (B'chir *et al.*, 2013). En cas d'hypoxie ou de carence en nutriments, les voies PERK (*protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase*)/eIF2 α (*eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*) ou EIF2AK4/eIF2 α sont activées et augmentent l'expression de certaines protéines autophagiques *via* le facteur de transcription ATF4 (Bretin *et al.*, 2016; Rouschop *et al.*, 2010). Le facteur de transcription p53 active également l'autophagie en induisant

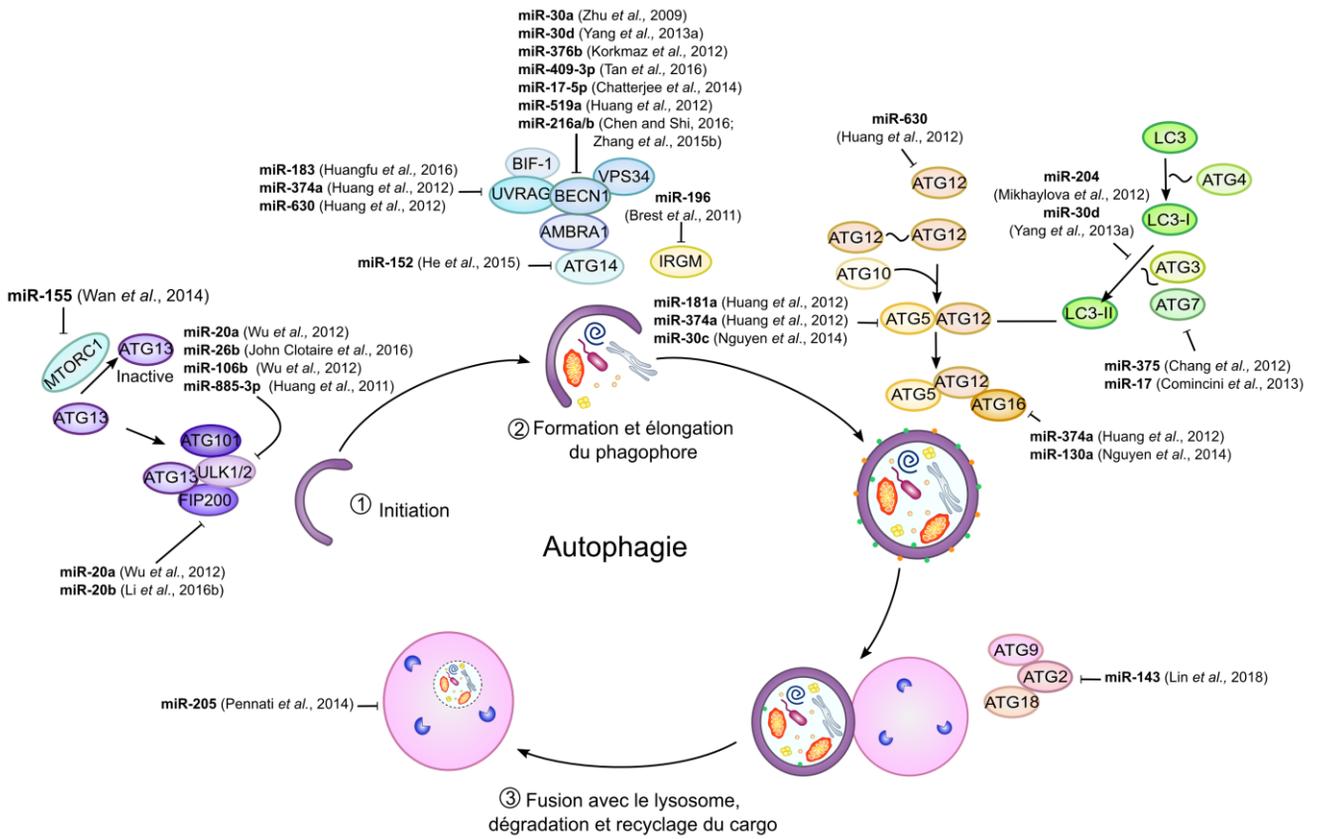


Figure 24 : Les microARNs au cours du processus macro-autophagique.

Représentation globale de l'autophagie et de sa régulation par les miARNs.

Les miARN peuvent cibler et réguler l'expression des protéines impliquées dans les différentes étapes de l'autophagie ou encore dans la régulation de cette dernière.

la transcription de gènes impliqués dans l'induction de l'autophagie et la maturation de l'autophagosome (Kenzelmann Broz *et al.*, 2013). P53 régule également l'expression et l'activité de FOXO3A (Miyaguchi *et al.*, 2009; Renault *et al.*, 2011) et favorise la translocation nucléaire de TFEB lors de dommages à l'ADN (Brady *et al.*, 2018).

Facteurs de transcription inhibant l'autophagie : D'autres facteurs de transcription exercent un effet inhibiteur sur l'autophagie tel que le facteur STAT1, dont l'activité est régulée par mTOR. En effet, l'inactivation de mTOR active STAT1 qui se lie alors à une séquence régulatrice du promoteur d'*ULK1*, empêchant ainsi son expression et limitant l'activation de l'autophagie (Goldberg *et al.*, 2017).

Facteurs de transcription pouvant activer ou inhiber l'autophagie : Certains facteurs présentent tantôt un effet inhibiteur, tantôt un effet activateur sur l'autophagie, comme STAT3 et NF- κ B. L'activation de la voie de signalisation JAK/STAT entraîne la phosphorylation de STAT3, sa dimérisation et sa translocation nucléaire. STAT3 peut alors soit inhiber l'autophagie en augmentant l'expression de régulateurs négatifs de ce processus tels que les membres de la famille BCL-2 ou en bloquant l'expression de *BECN1* ou *PIK3R1*, soit activer l'autophagie en augmentant l'expression d'*HIF1A* et *BNIP3* (*Bcl-2 19-kDa interacting protein 3*) (You *et al.*, 2015). Par ailleurs, l'activation de la voie NF- κ B permet au facteur de transcription NF- κ B de transloquer dans le noyau et d'induire l'expression de gènes favorisant l'autophagie tels que *BECN1* et *P62* (Copetti *et al.*, 2009; Ling *et al.*, 2012) ou de bloquer l'autophagie en interférant avec la liaison d'E2F1 (*eukaryotic translation elongation transcription factor 1*) au promoteur de *BNIP3* afin d'en inhiber la transcription (Shaw *et al.*, 2008).

Ces facteurs de transcription ne sont que quelques exemples des facteurs capables de réguler l'autophagie (Feng *et al.*, 2015) (**Tableau 7**).

III.3.3 Régulation post-transcriptionnelle

De nombreux miARN régulant l'expression de gènes intervenant à différents niveaux de l'autophagie ont été identifiés (**Figure 24**). L'induction de l'autophagie peut être régulée par les miR-20a, miR-106b (Wu *et al.*, 2012), miR-26b (John Clotaire *et al.*, 2016) et miR-885-3p (Huang *et al.*, 2011) inhibant l'expression des ARNm *ULK1* ou *ULK2*. Les miR-20a et miR-20b peuvent quant à eux réguler négativement l'autophagie en ciblant *FIP200* (Li *et al.*, 2016b). De plus, le miR-155 pourrait cibler de nombreux ARNm codant des protéines impliquées dans la voie mTOR, activant ainsi l'autophagie (Wan *et al.*, 2014).

La nucléation des vésicules peut être régulée par les miR-30a (Zhu *et al.*, 2009), miR-30d (Yang *et al.*, 2013a), miR-376b (Korkmaz *et al.*, 2012), miR-409-3p (Tan *et al.*, 2016), miR-17-5p (Chatterjee *et al.*, 2014), miR-519a (Huang *et al.*, 2012) et miR-216a/b (Chen and Shi, 2016; Zhang

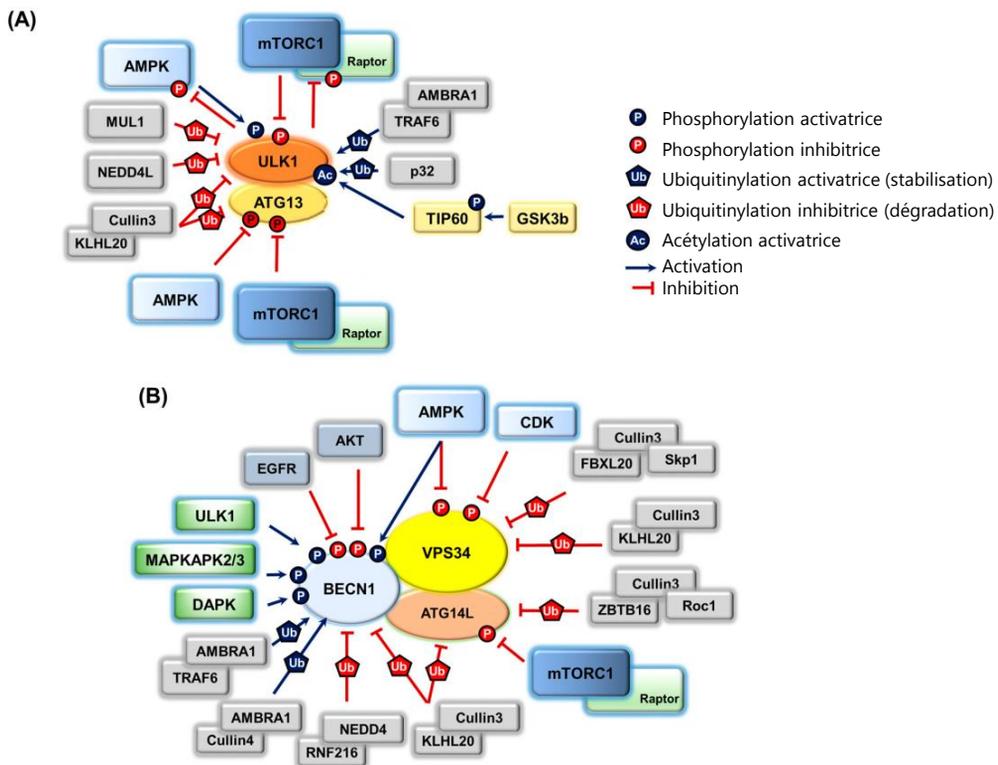


Figure 25 : Modifications post-traductionnelles et régulations des complexes ULK1 et Beclin 1.

A. Le complexe ULK1 est régulé par phosphorylation. Son activation est induite par phosphorylation de sa sous unité catalytique ULK1 par l'AMPK, tandis que son inhibition est entraînée par la phosphorylation de ULK1 par mTORC1 ou de ATG13 par MTOC1, PKA et AMPK. Le complexe ULK1 peut également être activé par ubiquitinylation de la sous-unité ULK1 médiée par AMBRA1-TRAF6 et p32, et inhibé par l'apposition de marques ubiquitine sur ULK1 par MUL1, NEDD4L, et Cullin3-KLHL20, et sur ATG13 par Cullin3-KLHL20, entraînant la dégradation du complexe. En réponse à une déplétion en facteurs de croissance, l'acétylation de ULK1 est augmentée par l'activation de l'axe acétyltransférase GSK3-TIP60, résultant en une activation de l'autophagie. ULK1 pourrait réguler négativement ses propres régulateurs, AMPK et mTORC1, en phosphorylant la protéine RAPTOR de mTORC1 et l'ensemble des sous-unités du complexe AMPK. **B.** La régulation par phosphorylation du complexe Beclin 1 est observée sur la sous-unité catalytique VPS34 (phosphorylation inhibitrice par AMPK et CDK), sur BECN1 (phosphorylation activatrice par AMPK, ULK1, MAPKAPK2/3 et DAPK ; phosphorylation inhibitrice par AKT/PKB et EGFR), sur ATG14L (phosphorylation inhibitrice par mTORC1) et sur UVRAG (phosphorylation inhibitrice par mTORC1). Les ubiquitinylations de VPS34 (ubiquitinylations dégradantes par FBXL20-Skp1-Cullin1 et Cullin3-KLHL20), BECN1 (ubiquitinylations dégradantes par NEDD4-RNF216 et Cullin3-KLHL20), ubiquitinylations stabilisatrices par AMBRA1-TRAF6 ou Cullin4) et ATG14L (ubiquitinylations dégradantes par ZBTB16-Cullin3-Roc1 et Cullin3-KLHL20) sont également importantes pour la régulation de l'autophagie (modifiée d'après Chun and Kim, 2018).

et al., 2015b) régulant négativement l'expression de *BECN1*. Les miR-183 (Huangfu *et al.*, 2016), miR-374a et miR-630 (Huang *et al.*, 2012) répriment l'ARNm *UVRAG* (*UV resistance-associated gene*), dont la protéine correspondante interagit avec la *BECN1* pour réguler la formation et la maturation de l'autophagosome. De même, le miR-152 peut cibler *ATG14* (He *et al.*, 2015). Le miR-196 réprime l'expression de la forme sauvage d'*IRGM*, mais pas de la forme mutée *IRGM^{C313T}* associée à la maladie de Crohn, conduisant à une expression anormale de la protéine *IRGM* dans cette maladie (Brest *et al.*, 2011).

L'élongation et la fermeture des vésicules peuvent également être modulées par différents miARN, tels que les miR-375 (Chang *et al.*, 2012) et miR-17 ciblant *ATG7* (Comincini *et al.*, 2013), contrôlant ainsi la conjugaison d'*ATG4* et *LC3*. Par ailleurs, de nombreux miARN modulent les systèmes de conjugaison *ATG12-ATG5-ATG16L1*, et notamment le miR-181a ciblant *ATG5*, le miR-630 ciblant *ATG12*, le miR-374a ciblant *ATG5* et *ATG16L1* (Huang *et al.*, 2012) et les miR-30c et miR-130a ciblant *ATG5* et *ATG16L1* (Nguyen *et al.*, 2014). De plus, le miR-204 inhibe l'expression de *LC3B* (Mikhaylova *et al.*, 2012) et miR-30d inhibe *ATG2B*, *ATG5*, *ATG12*, *BECN1* et *BNIP3L* (*BNIP3-like*), bloquant alors l'autophagie (Yang *et al.*, 2013a). Enfin, le miR-143 cible *ATG2B* impliquée dans l'élongation du phagophore afin d'inhiber l'autophagie *in vitro* (Lin *et al.*, 2018). Pour finir, le miR-205 interfère avec le flux autophagique en ciblant les protéines associées au lysosome, afin d'inhiber la dégradation des produits dans l'autolysosome (Pennati *et al.*, 2014).

Cette liste est non exhaustive, d'autres miARNs et ARN non codants peuvent réguler l'autophagie, tels que les lncRNAs et les ARN circulaires qui pourraient agir comme des éponges à miARN, empêchant ces derniers d'interagir avec leurs ARNm cibles et ayant ainsi un effet sur l'autophagie (Zhang *et al.*, 2017c).

III.3.4 Régulation post-traductionnelle

Plusieurs types de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'ubiquitinylation, l'acétylation ou encore la SUMOylation permettent de réguler finement le déroulement du processus autophagique.

III.3.4.1 La phosphorylation

Les complexes mTORC1 et AMPK jouent un rôle majeur dans la régulation du complexe ULK1 par phosphorylation sur différents résidus (**Figure 25**). En conditions homéostatiques, mTORC1 inhibe le complexe ULK1 par phosphorylation de sa sérine (S) 757 (Kim *et al.*, 2011a), empêchant son interaction avec l'AMPK, tandis que l'AMPK empêche l'activation d'ULK1 *via* la phosphorylation des résidus S638 et S758 (Shang *et al.*, 2011). mTORC1 et la voie de l'AMPK phosphorylent également *ATG13* sur la S258 et la S224 respectivement, le dissociant ainsi du

complexe ULK1 et inhibant l'induction de l'autophagie (Puente *et al.*, 2016). Lors d'une carence nutritionnelle, mTORC1 est inactivé, les résidus S258 et S224 d'ATG13 sont déphosphorylés (Puente *et al.*, 2016) et l'AMPK active ULK1 par phosphorylation des résidus S317 et S777 (Kim *et al.*, 2011a) et déphosphorylation des résidus S638 et S758, activant ainsi l'autophagie (Shang *et al.*, 2011). De même, suite à une carence énergétique, l'AMPK phosphoryle de multiples résidus sur ULK1, activant ce complexe pour induire l'autophagie (Egan *et al.*, 2011). La régulation entre ULK1 et mTORC1/AMPK est bidirectionnelle puisque ULK1 induit la phosphorylation de la sous-unité RAPTOR afin d'inhiber l'interaction entre mTORC1 et ses substrats et donc son activité kinase (Dunlop *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2011), et phosphoryle l'AMPK afin d'en diminuer l'activité (Löffler *et al.*, 2011). Ces régulations réciproques permettent de réguler finement la réponse aux carences énergétiques ou nutritionnelles.

De la même manière que le complexe ULK1 est phosphorylé par les complexes mTORC1 et AMPK, les protéines VPS34, BECN1 et ATG14L sont elles aussi phosphorylées directement par ces complexes sensibles aux carences nutritionnelles ou énergétiques (**Figure 25**). La protéine BECN1 peut être phosphorylée en de nombreux sites par de multiples kinases parmi lesquelles des MAPK (Wei *et al.*, 2015), ULK1 (Russell *et al.*, 2013) et DAPK (Zalckvar *et al.*, 2009) favorisant l'activation de l'autophagie ou encore AKT (Wang *et al.*, 2012a) et EGFR (*epidermal growth factor receptor*) inhibant l'autophagie (Wei *et al.*, 2013). De plus, ULK1 phosphoryle ATG14 sur la sérine 29 afin de favoriser la formation du complexe VPS34-BECN1 (Park *et al.*, 2016). L'AMPK, régulée par ATG14L, phosphoryle BECN1 pour activer le complexe VPS34-BECN1 (Kim *et al.*, 2013b), tandis que le complexe mTORC1 phosphoryle ATG14 pour inhiber le complexe VPS34-BECN1 et l'initiation de l'autophagie (Yuan *et al.*, 2013).

III.3.4.2 L'ubiquitinylation

L'ubiquitinylation d'ULK1 permet également de réguler sa stabilité et son activité (Nazio *et al.*, 2013)(**Figure 25**). Lors d'une activation de l'autophagie, AMBRA1 est déphosphorylée et interagit avec l'E3 ubiquitine-ligase TRAF6 ajoutant une chaîne poly-ubiquitine sur la lysine (K) 63 favorisant la dimérisation et l'activation d'ULK1 (Nazio *et al.*, 2013). De même, la protéine chaperonne-like p32 favoriserait la stabilité d'ULK1 et l'induction de l'autophagie en formant un complexe avec ULK1 et en permettant sa poly-ubiquitinylation sur la K63 suite à une carence en nutriments (Jiao *et al.*, 2015). L'ubiquitinylation peut également favoriser la dégradation d'ULK1. Lors d'une carence nutritionnelle, les E3 ubiquitine ligases MUL1 (*mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1*), NEDD4L (*NEDD4 Like E3 ubiquitin protein ligase*) et Cullin3-KLHL20 (*kelch like family member 20*), contrôlent l'amplitude et la durée de la réponse autophagique en induisant

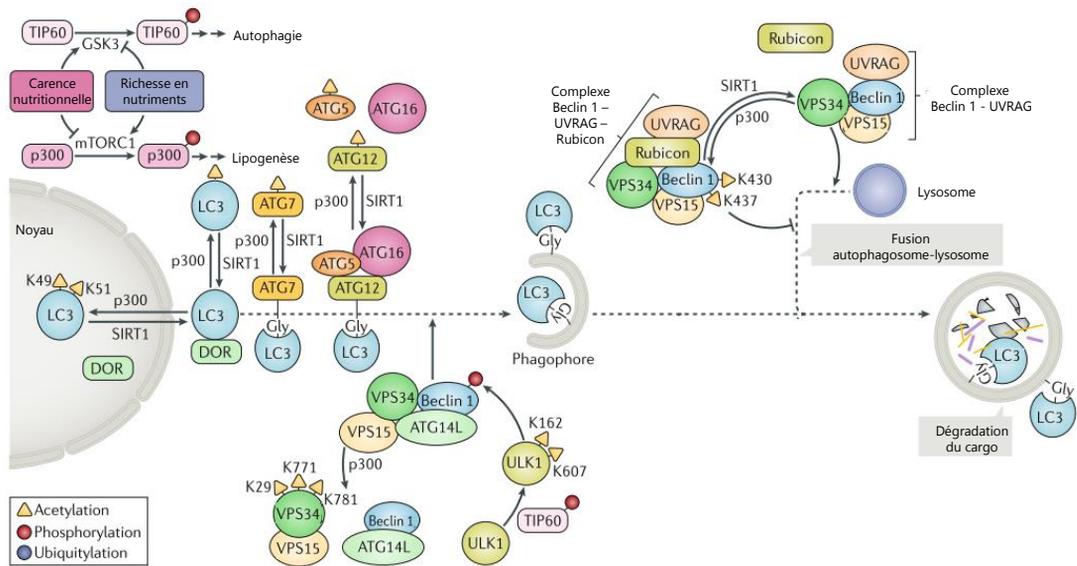


Figure 26 : Régulation de l'autophagie par acétylation de protéines non histones.

En conditions de carence nutritionnelle, la kinase GSK3 phosphoryle et active TIP60, qui favorise l'induction de l'autophagie en acétylant la kinase ULK1. En conditions de richesse en nutriments, le complexe mTORC1 phosphoryle et active p300, qui inhibe l'autophagie et favorise à la place la lipogenèse. P300 acétyle Beclin 1, VPS34, ATG5, ATG7, LC3 et ATG12. L'acétylation des protéines ATG inhibe la formation des autophagosomes. L'acétylation de Beclin 1 favorise le recrutement de Rubicon et UVRAG et inhibe la maturation de l'autophagosome. SIRT1 déacétyle les protéines ATG et Beclin 1. La déacétylation de LC3 par SIRT1 favorise son association avec DOR et son export du noyau, et la déacétylation de Beclin 1 favorise la maturation de l'autophagosome (modifiée d'après Narita *et al.*, 2019).

la dégradation d'ULK1 *via* la poly-ubiquitinylation en K27 et K29 (NEDD4L) (Nazio *et al.*, 2016) ou K48 (MUL1 et Cullin3) (Li *et al.*, 2015a; Liu *et al.*, 2016a).

L'ubiquitinylation des protéines du complexe VPS34-BECN1 permet également de réguler l'activation de l'autophagie ou d'induire la dégradation de ses composants, permettant une régulation fine du processus autophagique (Chun and Kim, 2018) (**Figure 25**).

Il a été également rapporté qu'une ubiquitinylation, en entraînant la dégradation du facteur de transcription TFEB, permet l'induction de l'autophagie (Sha *et al.*, 2017). Lorsque l'autophagie n'est pas nécessaire, la phosphorylation de TFEB par mTORC1 entraîne sa séquestration sous forme inactive dans le cytoplasme. Lors de l'activation de l'autophagie et de l'inactivation de mTORC1, TFEB est déphosphorylé et peut transloquer sous forme de dimère dans le noyau où il joue son rôle de facteur de transcription (Settembre *et al.*, 2012). La forme phosphorylée de TFEB est également modifiée par l'E3 ubiquitine ligase STUB1 (*STIP1 homology and U-Box containing protein 1*) qui entraîne son ubiquitinylation et sa dégradation. La dégradation des protéines TFEB ubiquitinylées augmente la quantité de protéines TFEB déphosphorylées dans le cytoplasme, qui peuvent s'homodimériser et transloquer dans le noyau (Sha *et al.*, 2017).

III.3.4.3 L'acétylation

L'acétylation joue également un rôle majeur dans la régulation d'ULK1 et de l'autophagie. En cas de stress du RE ou de carence en facteurs de croissance, mais pas de carence énergétique ou nutritionnelle, la kinase GSK3 (*glycogen synthase kinase-3*) stimule l'activité acétyltransférase de TIP60 par phosphorylation sur la S86, qui peut alors activer ULK1 par acétylation afin d'induire l'autophagie (Lin *et al.*, 2012a; Nie *et al.*, 2016) (**Figures 25 et 26**). L'activité de l'acétyltransférase p300 est induite par le complexe mTORC1 en cas de suffisance nutritionnelle. L'acétylation de la protéine VPS34 par l'acétyltransférase p300 diminue son affinité pour le phosphatidylinositol et son acétylation bloque la formation du complexe VPS34-BECN1, inhibant ainsi son activité kinase et donc l'initiation de l'autophagie (Su *et al.*, 2017). La déacétylation de LC3 par la déacétylase SIRT1 (sirtuine 1) permet son transport du noyau au cytoplasme (Huang *et al.*, 2015). Dans le cytoplasme, en absence de carence nutritionnelle, p300 inhibe l'induction de l'autophagie par acétylation de multiples protéines telles qu'ATG5, ATG7, ATG12 et LC3 (Lee and Finkel, 2009). L'acétylation de LC3 par p300 inhibe l'interaction de p62 (appelé également SQSTM1, *sequestosome 1*) avec des protéines LC3 non engagées dans le processus autophagique afin de limiter la dégradation de LC3 par le protéasome, garantissant ainsi la reconnaissance spécifique des cargos autophagiques et la disponibilité de LC3 pour l'autophagie (Lee and Finkel, 2009; Song *et al.*, 2019). Enfin, l'acétylation de BECN1 par p300 favorise le recrutement d'UVRAG et Rubicon et inhibe la maturation de l'autophagosome (Sun *et al.*, 2015) (**Figure 26**).

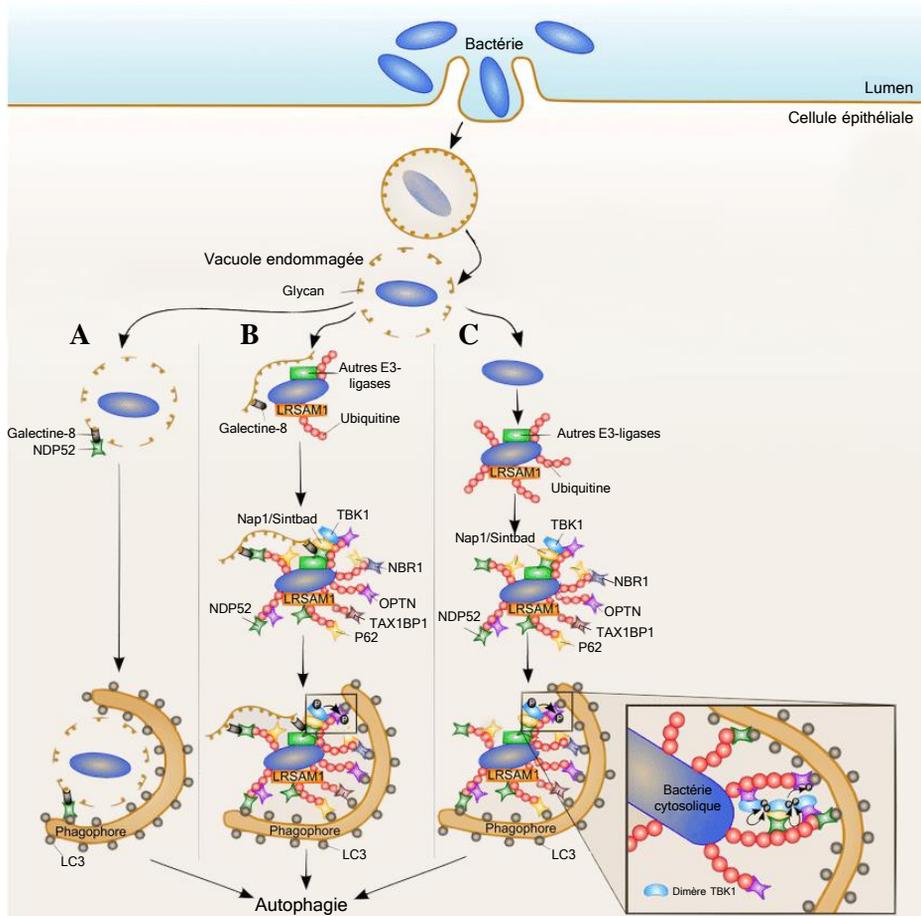


Figure 27 : Rôle des récepteurs autophagiques dans le ciblage des bactéries au phagosome.

La bactérie entrant dans la cellule se retrouve dans une vacuole. Cette bactérie peut parfois s'échapper de sa vacuole et rejoindre le cytoplasme. Cependant, avant de se retrouver dans le cytoplasme, la bactérie se retrouve dans une vacuole endommagée et est partiellement exposée au cytosol. **A.** La galectine-8 peut se lier aux glycanes de l'hôte, qui sont normalement retrouvés à l'intérieur de la vacuole contenant la bactérie. La galectine-8 cible les vacuoles endommagées contenant la bactérie à l'autophagie en se liant au récepteur autophagique NDP52. **B.** Parallèlement à la galectine-8, l'ubiquitine est un signal important pour le ciblage des bactéries retrouvées dans des vacuoles endommagées à l'autophagie. La bactérie est ubiquitinylée par des E3-ubiquitine ligases telles que LRSAM1. Les récepteurs de l'autophagie p62, NDP52, NBR1, TAX1BP1 et OPTN servent alors d'adaptateur pouvant lier d'une part les chaînes ubiquitine et d'autre part les molécules LC3 situées sur le phagosome. L'affinité de l'OPTN pour LC3 est amplifiée par la phosphorylation de l'OPTN par TBK1. Le mécanisme d'action supposé de TBK1 est représenté dans la vue détaillée. TBK1 est recrutée *via* le complexe Nap1/Sintbad-NDP52 et l'OPTN aux bactéries ubiquitinylées. Ce recrutement induit une augmentation de la concentration locale en dimères de TBK1, résultant en leur oligomérisation et leur autophosphorylation. **C.** Les bactéries cytosoliques sont seulement ciblées à l'autophagie *via* l'ubiquitine et non par la galectine-8 (modifiée d'après Scheidel *et al.*, 2016).

III.3.4.4 La SUMOylation

L'autophagie peut être régulée par la SUMOylation. Plusieurs cibles des protéines SUMO impliquées dans l'autophagie ont été identifiées. La lysine acétyltransférase TIP60 serait SUMOylée par la SUMO E3 ligase PIAS γ (*protein inhibitor of activated STAT protein γ*), stimulant son activité catalytique et favorisant l'induction de l'autophagie (Naidu *et al.*, 2012). Lors de l'activation de l'autophagie, VPS34 serait également sumoylée par l'E3 ligase KAP1 (*KRAB-associated protein-1*), augmentant l'activité de VPS34 et stimulant ainsi l'autophagie (Yang *et al.*, 2013b). En modèle d'hypertension artérielle pulmonaire induite par une hypoxie, la SUMOylation de la protéine VPS34 favorise l'assemblage du complexe BECN1, activant l'autophagie et la différenciation des cellules du muscle lisse vasculaire, remodelant ainsi la vascularisation pulmonaire et entraînant une hypertension artérielle pulmonaire (Yao *et al.*, 2019). La BECN1 de ce complexe peut également être SUMOylée par PIAS3 et désSUMOylée par la peptidase SENP3 (*sentrin-specific protease 3*) (Liu *et al.*, 2019). Suite à une carence en acide aminés, la SUMOylation de BECN1 est augmentée, favorisant la formation de l'autophagosome en facilitant son interaction avec les autres protéines du complexe PI(3)K et l'activité de ce dernier. A l'inverse, la désSUMOylation de BECN1 par SENP3 altère la formation ou la stabilité du complexe PI(3)K et supprime son activité, limitant l'induction de l'autophagie, permettant de ce fait une régulation fine de ce processus (Liu *et al.*, 2019). Enfin, les AIEC favoriseraient leur propre réplication en inhibant l'autophagie *via* la modulation de la SUMOylation des protéines de l'hôte, bien que ces dernières n'aient pour le moment pas été spécifiquement identifiées (Dalmaso *et al.*, 2019).

III.4 Autophagie et réponse aux bactéries intracellulaires : la xénophagie

Tous les pathogènes intracellulaires peuvent potentiellement être ciblés et dégradés par la xénophagie. Sa sélectivité dépend de la reconnaissance des substrats par les récepteurs autophagiques. Suite à leur prise en charge par ces récepteurs, ces bactéries peuvent être dégradées par l'autophagie ou bien échapper à ce mécanisme et même le détourner pour leur propre réplication.

III.4.1 Les récepteurs de la xénophagie

La xénophagie est initiée par l'ubiquitylation du pathogène (Boyle and Randow, 2013). Le pathogène ubiquitylé est alors associé aux membranes de l'autophagosome contenant LC3 *via* le recrutement de récepteurs de l'autophagie, notamment p62, TAX1BP1 (*tax1 binding protein 1*), NBR1 (*next to BRCA1 gene 1 protein*), NDP52 et optineurine (**Figure 27**). Ces récepteurs contiennent à la fois un domaine de liaison à l'ubiquitine et une région d'interaction avec LC3 (LIR, *LC3-interacting region*), permettant ainsi d'associer le substrat ubiquitylé à la machinerie autophagique (Kim *et al.*, 2016). Le fonctionnement de ces récepteurs repose sur la kinase TBK1

(*TANK-binding kinase 1*). En effet, la phosphorylation de p62 (Pilli *et al.*, 2012) et optineurine (Richter *et al.*, 2016; Wild *et al.*, 2011) par TBK1 augmente leur affinité pour les protéines ubiquitine sur le substrat et pour la protéine LC3. De plus, le recrutement de TBK1 au récepteur NDP52 est nécessaire pour l'activation de la xénophagie (Thurston *et al.*, 2009). En cas de rupture de l'endosome par un pathogène, p62 favorise l'ubiquitinylation en moins de 3 minutes de ce pathogène (Tsuchiya *et al.*, 2018). En plus des ubiquitines, NDP52 reconnaît les bactéries intracellulaires en se liant à la galectine-8 associée aux membranes des vacuoles endommagées contenant ces bactéries (Thurston *et al.*, 2012). L'initiation de la xénophagie suite à la liaison de NDP52 à la galectine-8 nécessite la trimérisation de NDP52 avec les sous-unités FIP200 et TBKBP1 (*TBK1 binding protein 1*) des complexes ULK et TBK1 respectivement, afin de recruter la machinerie autophagique pour permettre la formation du phagophore puis l'attachement du récepteur à LC3 (Ravenhill *et al.*, 2019).

En plus de leur rôle dans la reconnaissance des pathogènes, ces récepteurs sont impliqués dans d'autres étapes de l'autophagie. Lors de l'initiation, l'optineurine favorise la formation de l'autophagosome en augmentant la production de LC3-II et la maturation du phagophore en facilitant le recrutement du complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 à sa membrane (Bansal *et al.*, 2018). De plus, l'optineurine, NDP52 et TAX1BP1 permettent la maturation des autophagosomes et leur fusion avec le lysosome en interagissant d'une part avec les protéines LC3 associées à l'autophagosome et d'autre part avec la myosine VI qui permet l'adressage des autophagosomes vers la voie endolysosomale (Tumbarello *et al.*, 2012, 2015; Verlhac *et al.*, 2015). Le récepteur p62 est localisé au niveau du phagophore même en absence d'interaction avec LC3 et est dégradé au cours du flux autophagique, ce qui fait de la diminution de l'accumulation de p62 un marqueur de l'activation d'une autophagie fonctionnelle (Klionsky *et al.*, 2016).

D'autres protéines permettent la formation et l'expansion du phagophore au niveau des sites d'invasion par les bactéries, telles que WIPI2 recrutée de manière dépendante de TBK1 (Thurston *et al.*, 2016), ainsi que son partenaire TECPR1 (*tectonin beta-propeller repeat containing 1*) (Ogawa *et al.*, 2011) ou encore les récepteurs NOD1 et NOD2 interagissant physiquement avec ATG16L1 lors de la reconnaissance du MDP bactérien et recrutant la machinerie autophagique au site d'entrée des bactéries (Cooney *et al.*, 2010; Travassos *et al.*, 2010).

III.4.2 L'interaction entre les bactéries et la xénophagie

Suite à une invasion bactérienne, la xénophagie est induite afin d'éliminer les bactéries, que celles-ci se trouvent libres dans le cytosol ou au sein de vacuoles ou de phagosomes. Cependant, certaines bactéries ont développé de multiples stratégies afin d'éviter d'être reconnues par la

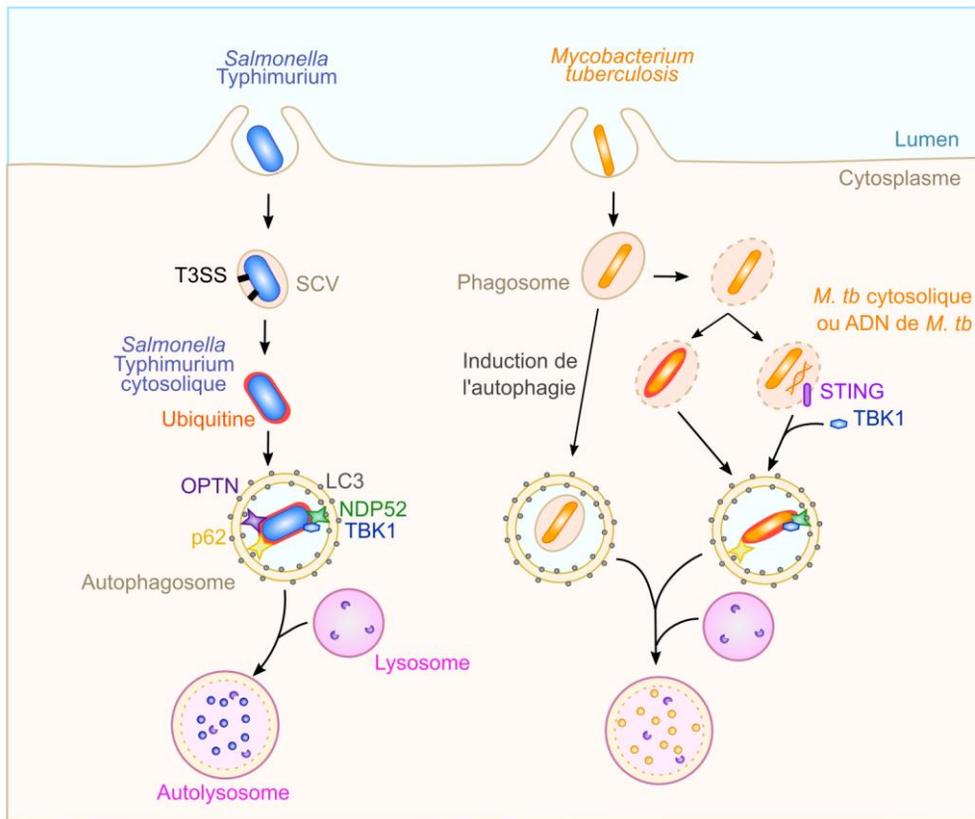


Figure 28 : Les bactéries contrôlées par l'autophagie.

Salmonella Typhimurium, lors de la mise en place de son système de sécrétion de type III peut endommager sa vacuole d'endocytose (SCV). La bactérie, en contact avec les éléments du cytosol, est alors ubiquitinylée puis reconnue par les récepteurs de l'autophagie qui la cible aux autophagosomes pour permettre son élimination *via* le processus autophagique. L'infection par *Mycobacterium tuberculosis* entraîne l'activation de l'autophagie afin d'éliminer le pathogène. Cependant, *M. tuberculosis* peut également endommager la membrane du phagosome non mature, entraînant l'exposition de la bactérie aux récepteurs de l'autophagie tels que p62 ou NDP52, qui se lient aux ubiquitines et permettent l'élimination des bactéries *via* l'autophagie. L'ADN des mycobactéries peut également être détecté par STING, un adaptateur important de la kinase TBK1, activant cette dernière et conduisant à l'ubiquitinylation de la bactérie et au recrutement des récepteurs de l'autophagie, permettant l'élimination des mycobactéries par ce processus.

machinerie autophagique, de limiter l'induction de ce processus et même d'exploiter l'autophagie pour assurer leur survie et leur propre réplication.

III.4.2.1 Le contrôle des bactéries par la xénophagie

Lors de l'infection des cellules épithéliales, *Salmonella* Typhimurium réside dans une vacuole appelée SCV (*Salmonella-containing vacuole*) mais peut en altérer l'intégrité en y formant des pores lors de la mise en place de son T3SS. Une fois libre dans le cytosol, *Salmonella* est ubiquitinylée et reconnue par les récepteurs autophagiques, ce qui entraîne la formation d'autophagosomes positifs pour LC3 autour de la bactérie (Huang and Brumell, 2014) (**Figure 28**). L'infection de macrophages murins par *Mycobacterium tuberculosis* active l'autophagie afin d'éliminer le pathogène (Singh *et al.*, 2006). *M. tuberculosis* peut endommager la membrane du phagosome non mature grâce à son système de sécrétion ESX-1 (*6-kDa early secretory antigenic target (ESAT-6) secretion system 1*), permettant l'accès des récepteurs autophagiques p62 et NDP52 au pathogène dans le phagosome et son élimination *via* l'autophagie. De plus, la reconnaissance de l'ADN bactérien extracellulaire par la protéine STING (*stimulation of interferon genes*), un adaptateur important de la kinase TBK1, est nécessaire à l'ubiquitylation de la bactérie et à sa délivrance aux autophagosomes par p62 et NDP52 (Watson *et al.*, 2012) (**Figure 28**). L'ubiquitine peut reconnaître directement la protéine de surface Rv1468c de *M. tuberculosis* qui contient un domaine associé à l'ubiquitine eucaryote-*like* sans nécessiter l'intervention d'une ubiquitine ligase E3. L'ubiquitine est alors reconnue par le récepteur p62, permettant ainsi la délivrance de la bactérie aux autophagosomes associés à LC3 (Chai *et al.*, 2019).

III.4.2.2 L'échappement des bactéries à la machinerie autophagique

III.4.2.2.1 Evitement de la reconnaissance par la machinerie autophagique

L'une des stratégies utilisées par les pathogènes pour éviter la dégradation par la xénophagie est d'éviter d'être reconnus par la machinerie autophagique. Par exemple, *Listeria monocytogenes* est capable de s'échapper de son phagosome en exprimant la listériolysine O (Tan *et al.*, 2018) et de survivre dans le cytosol en sécrétant les facteurs de virulence *ActA* et *InlK* lui permettant de recruter des protéines de l'hôte, respectivement l'actine et la protéine vault majeure, afin de former un manteau protecteur cachant la bactérie (Mitchell *et al.*, 2018). De plus, cette bactérie exprime la phospholipase C prévenant la formation de PI(3)P, et donc de l'autophagosome dans ces cellules (Mitchell *et al.*, 2015) (**Figure 29**). De même, *Shigella flexneri* est capable de s'échapper du phagosome et d'exprimer le facteur IcsB se liant à la protéine de surface bactérienne VirG afin que cette protéine ne puisse plus se lier à ATG5 (Campbell-Valois *et al.*, 2015). IcsB, en association avec le facteur VirA, bloque le recrutement de LC3 à la vacuole d'entrée de la bactérie et facilite

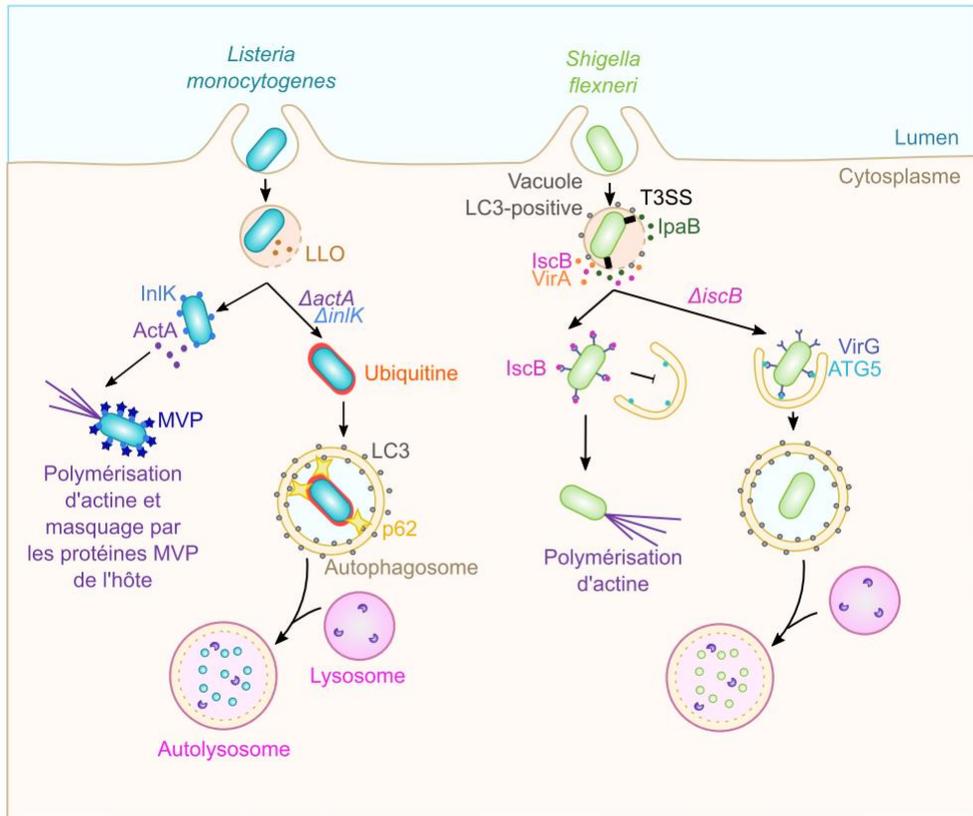


Figure 29 : Les bactéries qui échappent à l'autophagie.

Listeria monocytogenes s'échappe de sa vacuole d'endocytose en sécrétant la listériolysine O (LLO). Libre dans le cytoplasme, elle exprime la protéine ActA permettant la polymérisation de l'actine de la cellule hôte et la protéine InlK ancrée à la surface de la bactérie et permettant le recrutement des protéines vault majeures (MVP) de l'hôte, empêchant ainsi sa reconnaissance par l'autophagie. Un mutant pour les protéines ActA ($\Delta actA$) et InlK ($\Delta inlK$) fixe des peptides ubiquitinylés qui recrutent p62, ce qui conduit à la séquestration et la dégradation de la bactérie dans un autolysosome. Suite à son entrée dans la cellule, *Shigella flexneri* se retrouve dans une vacuole positive pour LC3. La bactérie, via un système de sécrétion de type III, sécrète l'effecteur bactérien IpaB responsable de la lyse de sa vacuole d'endocytose ainsi que les effecteurs IscB et VirA lui permettant de s'échapper de la vacuole LC3-positive. La bactérie est maintenant libre dans le cytoplasme et masque sa reconnaissance par la protéine de l'autophagie ATG5 grâce à la protéine bactérienne IscB masquant la protéine VirG. Ainsi, la bactérie n'est pas prise en charge dans un autophagosome et peut se disséminer en recrutant à un de ses pôles la machinerie eucaryote nécessaire à la polymérisation d'actine. Un mutant pour la protéine IcsB ($\Delta icsB$), exposant VirG, est lui séquestré dans un autophagosome puis dégradé par l'autophagie.

l'échappement de *S. flexneri* des vacuoles LC3-positives formées (Campbell-Valois *et al.*, 2015) (**Figure 29**).

III.4.2.2 Inhibition de l'induction de l'autophagie

Les bactéries peuvent bloquer l'induction de l'autophagie et la formation de l'autophagosome. L'altération de la SCV lors de la mise en place du T3SS par *S. Typhimurium* entraîne le recrutement de la machinerie autophagique, qui va alors réparer les dommages à la membrane. Ceci permet l'acquisition des protéines Rab5, Rab7 et LAMP1 (*lysosome-associated membrane glycoprotein 1*) permettant la maturation de ce compartiment, la survie et la réplication intracellulaire de la bactérie (Kreibich *et al.*, 2015) (**Figure 30**). *S. Typhimurium* recrute ensuite la kinase FAK à sa vacuole afin d'activer la voie AKT-mTOR permettant de restaurer l'activation de mTOR et ainsi d'inhiber l'autophagie dans les cellules épithéliales, les fibroblastes et les macrophages (Owen *et al.*, 2014). *Legionella pneumophila* injecte la cystéine protéase RavZ dans le cytoplasme des cellule hôtes, où elle dé-conjuge irréversiblement les protéines LC3-II de leur PE (Choy *et al.*, 2012) et prévient le recrutement de l'ubiquitine à la vacuole contenant la bactérie (Kubori *et al.*, 2017), inhibant ainsi sa reconnaissance par l'autophagie mais aussi la formation de l'autophagosome (**Figure 30**).

L'interaction entre ATG16L1 et la protéine C3 du complément opsonisant les bactéries joue un rôle important dans l'initiation de la xénophagie. Tandis que *Listeria monocytogenes* opsonisée par la protéine C3 est éliminée par l'autophagie via l'interaction C3-ATG16L1, *S. flexneri* et *S. Typhimurium* expriment des protéases de membrane externe, les omptines, clivant la protéine C3, leur permettant d'échapper à l'élimination par l'autophagie médiée par la protéine C3 (Sorbara *et al.*, 2018) (**Figure 30**).

III.4.2.3 L'utilisation de l'autophagosome comme niche de réplication

Plusieurs bactéries peuvent bloquer la maturation de l'autophagosome afin de s'en servir de niche de réplication. Par exemple, les bactéries AIEC survivent dans les neutrophiles en bloquant l'autophagie au stade de l'autolysosome (Chargui *et al.*, 2012). Par ailleurs, *Yersinia pseudotuberculosis* (Moreau *et al.*, 2010) et *Staphylococcus aureus* (Schnaith *et al.*, 2007) sont capables de bloquer la maturation et la fusion des autophagosomes avec les lysosomes afin de s'en servir de niche de réplication. Bien que les mécanismes sous-jacents restent à identifier, l'exploitation de la machinerie autophagique par *S. aureus* nécessite le système bactérien *Agr* (*accessory gene regulator*), et plus spécifiquement *Hla* (α -hémolysine) sécrétée par ce système (Mestre *et al.*, 2010). De plus, l'expression du facteur de virulence IsaB par les souches de *S. aureus*

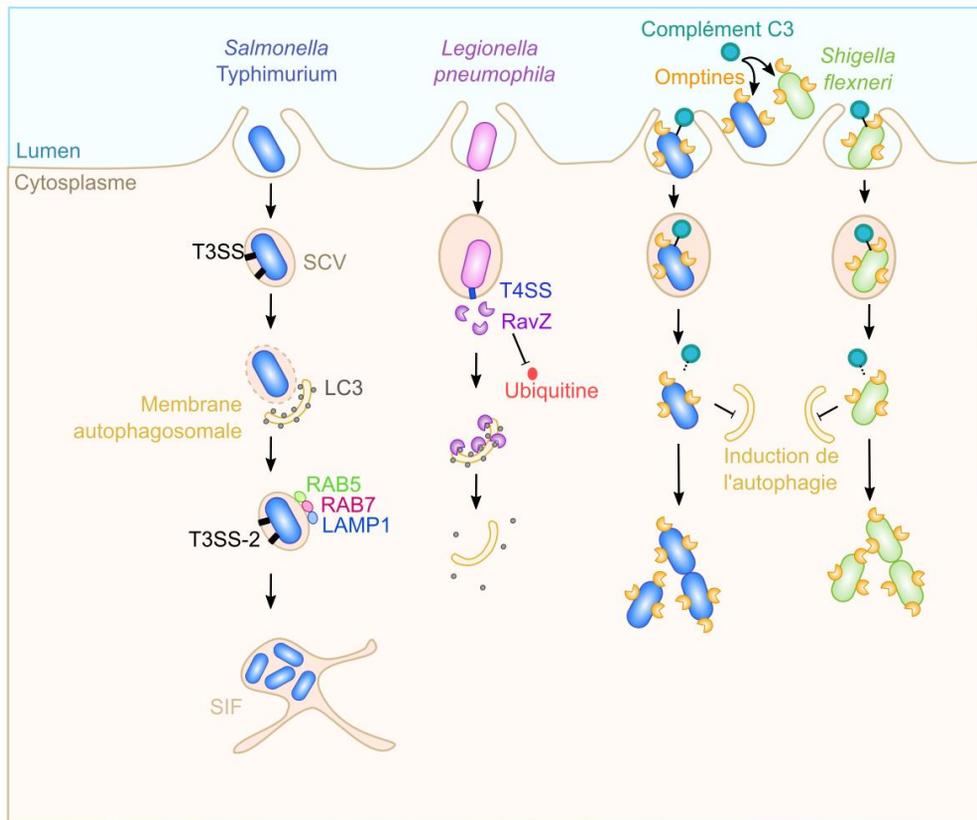


Figure 30 : Les bactéries inhibant l'induction de l'autophagie.

Après internalisation par les cellules hôtes, *Salmonella Typhimurium* réside dans sa vacuole SCV. Alors que le T3SS est requis pour l'invasion bactérienne, cet appareil semblable à une aiguille peut causer des dommages à la SCV. Les *Salmonella* peuvent utiliser la machinerie autophagique pour réparer les dommages induits par leur T3SS aux SCV en recrutant les protéines LC3 associées à la membrane autophagosomale. Ceci permet le recrutement, dans un deuxième temps, des protéines Rab5 puis Rab7 et LAMP afin de permettre la maturation du compartiment réparé et l'expression d'un deuxième T3SS (T3SS-2) par la bactérie, permettant la formation d'une vacuole filamenteuse facilitant la survie bactérienne. La bactérie *Legionella pneumophila* sécrète la protéine effectrice RavZ via son système de sécrétion de type IV (T4SS). RavZ est une protéase capable d'inhiber le recrutement de l'ubiquitine à la vacuole contenant la bactérie et de cliver la protéine LC3 associée aux membranes pré-autophagosomales de manière irréversible, prévenant ainsi la formation de l'autophagosome. Au niveau du lumen intestinal, les bactéries *Salmonella Typhimurium* et *Shigella flexneri* sont opsonisées par les protéines C3 du complément. Ces bactéries expriment des omptines à leur surface, des protéines capables d'enlever les protéines C3 recouvrant les bactéries, permettant ainsi aux bactéries cytosoliques d'échapper à l'élimination par l'autophagie médiée par le complément C3. SIF, *Salmonella-induced filament*.

résistantes à la méthicilline permet à ces souches d'inhiber le flux autophagique afin de favoriser leur survie (Liu *et al.*, 2015).

III.4.2.4 Modulation des miARN de l'hôte contrôlant l'autophagie

L'infection par différentes bactéries pathogènes ou pathobiontes modifie l'expression des miARN de l'hôte, pouvant moduler l'expression des protéines de l'autophagie et interférer avec le bon déroulement de ce processus (**Figure 31**). *M. tuberculosis* induit l'expression du miR-27a via l'activation des voies ERK-MAPK et NF- κ B. Ce miARN cible l'ARNm codant pour le transporteur d'ions Ca^{2+} CACNA2D3 (*voltage-dependent calcium channel subunit α -2/ δ -3*) situé sur le RE, diminuant ainsi la signalisation Ca^{2+} , ce qui inhibe la formation de l'autophagosome et favorise la survie intracellulaire de la bactérie (Liu *et al.*, 2018b). Cette bactérie contrôle également l'initiation de l'autophagie en inhibant BECN1 et UVRAG via l'augmentation des miR-30a et miR-125a respectivement (Chen *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015). Par ailleurs, l'augmentation du miR-144-5p lors de l'infection par *M. tuberculosis* supprime l'autophagie en inhibant DRAM2 (*DNA damage regulated autophagy modulator 2*), une protéine de l'autophagie découverte récemment et interagissant avec la BECN1 et UVRAG afin d'activer le complexe Beclin 1 (Kim *et al.*, 2017a). *Mycobacterium bovis* va à l'inverse augmenter le miR-17 afin de réprimer ULK1 (Duan *et al.*, 2015), favorisant la survie des mycobactéries en interférant avec l'autophagie.

L'infection par *M. bovis* augmente le niveau du miR-20a réprimant ATG7 et ATG16L1 nécessaires à la maturation de l'autophagosome (Guo *et al.*, 2016). De même, l'augmentation du miR-144-3p suite à l'infection par le BCG (Bacille de Calmette et Guérin) compromet la formation de l'autophagosome en diminuant le niveau d'ATG4A (Guo *et al.*, 2017). Enfin, *M. tuberculosis* interfère avec l'autophagie d'une manière plus globale en induisant l'expression du miR-33, qui diminue l'expression de plusieurs protéines de l'autophagie (ATG5, ATG12, MAP1LC3B, UVRAG et LAMP1) et en ciblant l'ARNm PRKAA1 (*protein kinase amp-activated catalytic subunit alpha 1*) codant pour la sous-unité α de l'AMPK (Ouimet *et al.*, 2016).

Suite à l'infection par *Helicobacter pylori*, le miR-30b est augmenté et inhibe l'expression de BECN1 et ATG12, diminuant ainsi la formation et la maturation de l'autophagosome (Tang *et al.*, 2012). BECN1 et ATG12 ainsi que ATG2B, ATG5 et BNIP3L sont également inhibés par le miR-30d induit par l'infection par *H. pylori* (Yang *et al.*, 2016). L'infection de cellules épithéliales pulmonaires par *Burkholderia pseudomallei* augmente l'expression des miR-4458, miR-4667-5p et miR-4668-5p réprimant l'expression de la protéine ATG10 essentielle à la maturation de l'autophagosome (Li *et al.*, 2015b).

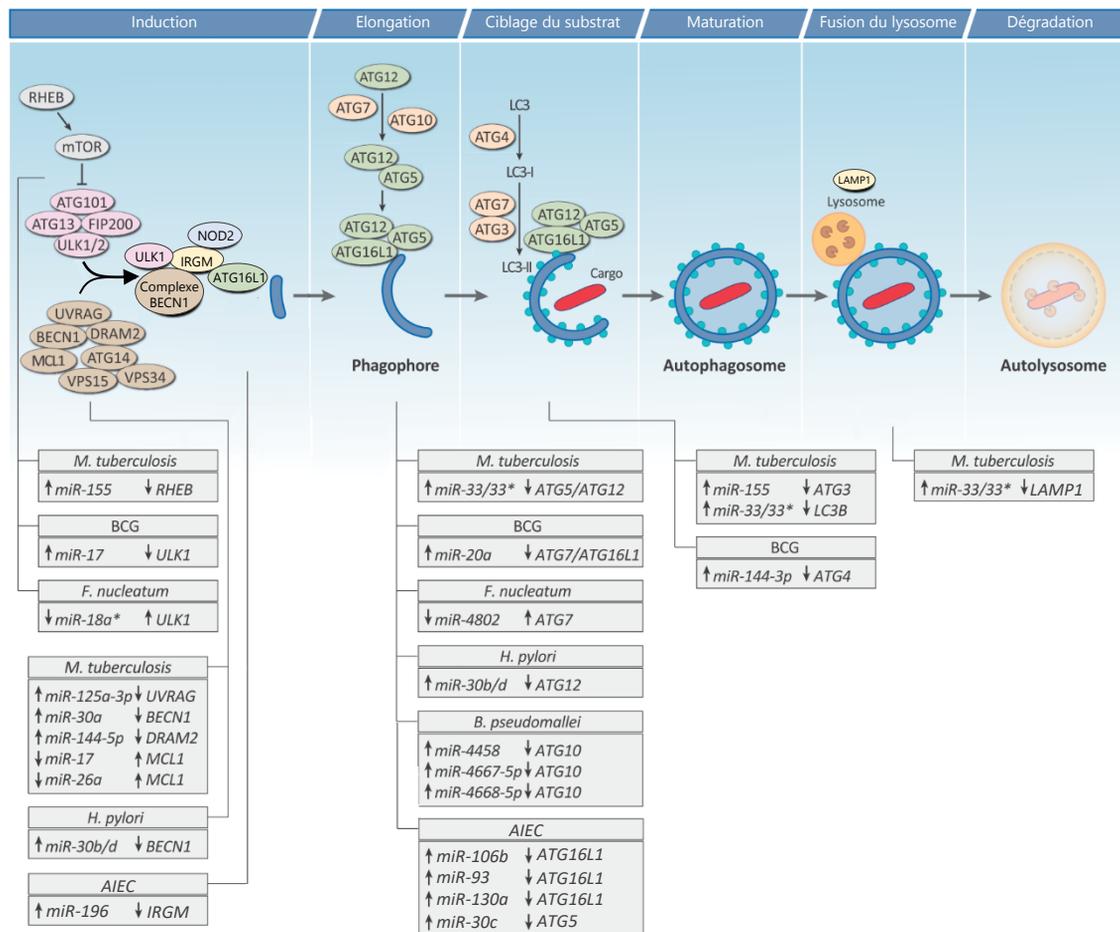


Figure 31 : Modulation des miARN de l'hôte contrôlant la machinerie autophagique par les bactéries.

L'infection par différentes bactéries pathogènes ou pathobiontes conduit à l'altération de l'expression de miARN régulant différentes étapes de l'autophagie. Un effet communément observé suite à la modulation des miARN par les bactéries est l'inhibition de l'autophagie et donc de la dégradation des bactéries. *F. nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum*; *B. pseudomallei*, *Burkholderia pseudomallei* (modifiée d'après Aguilar *et al.*, 2019, Lu *et al.*, 2014, Nguyen *et al.*, 2014, et Chauhan *et al.*, 2015).

Le polymorphisme C313T d'*IRGM* associé à la MC altère la fixation du miR-196, entraînant une perte de régulation du gène *IRGM* par ce dernier, conduisant à une autophagie défectueuse et à une réplication intracellulaire augmentée des bactéries AIEC associées à la MC (Brest *et al.*, 2011). De plus, la souche AIEC LF82 augmente les niveaux des miR-106b et miR-93 dans de nombreuses lignées cellulaires humaines, inhibant l'expression d'*ATG16L1* et diminuant ainsi l'élimination des AIEC par l'autophagie (Lu *et al.*, 2014). Nous avons également montré *in vitro* et *in vivo* que les AIEC augmentent les niveaux des miR-30c et miR-130a, diminuant respectivement l'expression d'*ATG5* et d'*ATG16L1* en cellules épithéliales intestinales, inhibant ainsi l'induction de l'autophagie, conduisant à une réplication intracellulaire anormale des AIEC et à une augmentation de l'inflammation (Nguyen *et al.*, 2014). Une corrélation inverse entre les niveaux des miR-30c et miR-130a et ceux des ARNm *ATG5* et *ATG16L1* a été observée dans la muqueuse iléale des patients atteints de MC, suggérant que les AIEC diminueraient l'autophagie pour favoriser leur propre colonisation dans la MC.

III.5 Autophagie, physiopathologie intestinale et maladie de Crohn

III.5.1 Généralités

La première preuve de l'implication de l'autophagie dans l'étiologie de la MC provient des GWAS ayant mis en évidence une association entre la présence des SNP dans les gènes de l'autophagie *ATG16L1* et *IRGM* et une augmentation de la susceptibilité à développer la MC (Hampe *et al.*, 2007; Parkes *et al.*, 2007; Prescott *et al.*, 2007). La découverte de l'interaction entre *NOD2*, un premier gène de susceptibilité à la MC (Hugot *et al.*, 2001), et *ATG16L1* lors d'une xénophagie fonctionnelle contre l'infection bactérienne renforce le lien entre l'autophagie et la MC. Les GWAS ont identifié d'autres gènes de susceptibilité à développer la MC, qui codent pour des protéines impliquées dans la régulation de l'activation de l'autophagie telles que *LRRK2* (*leucine rich repeat kinase 2*) (Barrett *et al.*, 2008), *PTPN2* (Glas *et al.*, 2012) ou *PTPN22* (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*) (Diaz-Gallo *et al.*, 2011), l'initiation de l'autophagie telles que *ULK1* (Henckaerts *et al.*, 2011), ou la reconnaissance bactérienne par l'autophagie telles que le récepteur *TLR4* (Oostenbrug *et al.*, 2005) ou le récepteur autophagique *NDP52* (Ellinghaus *et al.*, 2013).

Des études fonctionnelles ont ensuite montré les mécanismes moléculaires par lesquels un défaut de l'autophagie pourrait entraîner une perturbation de l'homéostasie intestinale, une dysbiose intestinale, une anomalie de la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth, un stress du RE au niveau de l'épithélium et une réponse immunitaire aberrante, qui sont des caractéristiques de la pathogenèse de la MC.

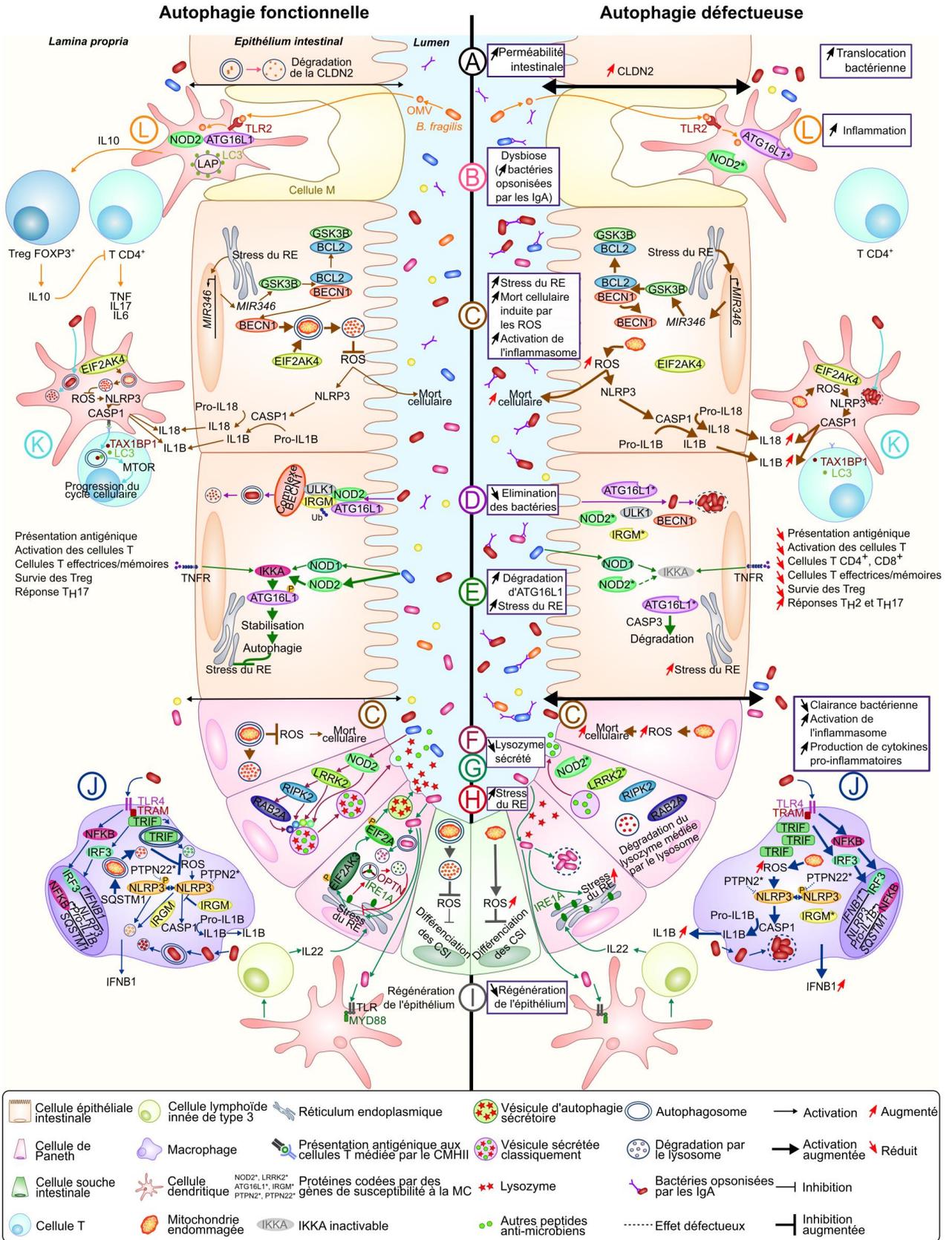


Figure 32 : Rôle de l'autophagie dans la maintenance de l'homéostasie intestinale et mécanismes potentiels par lesquels une autophagie défectueuse pourrait contribuer au développement des MICI.

III.5.2 Régulation de l'homéostasie intestinale par l'autophagie

III.5.2.1 Rôle de l'autophagie dans la fonction barrière de l'épithélium

L'autophagie régule la fonction de barrière intestinale en induisant la dégradation de la CLDN2, diminuant ainsi la perméabilité intestinale (Nighot *et al.*, 2015). L'augmentation du niveau de la CLDN2 et les défauts des jonctions serrées observées en monocouche de cellules épithéliales intestinales Caco-2 traitées au TNF- α proviennent en partie de l'inhibition de la dégradation de la CLDN2 médiée par l'autophagie (Zhang *et al.*, 2017a) (**Figure 32A**).

L'autophagie contrôle le développement des cellules caliciformes, qui participent à la fonction barrière de l'épithélium en sécrétant des mucines, puisqu'une altération de la morphologie de ces cellules a été observée en présence du polymorphisme *ATG16L1*^{T300A} (Lassen *et al.*, 2014).

III.5.2.2 Rôle de l'autophagie dans la mort cellulaire

L'autophagie peut moduler la mort cellulaire induite suite à un stress prolongé au niveau de l'épithélium intestinal. En effet, lors d'un stress cellulaire, la voie eIF2 α /ATF4 est activée, favorisant les effets pro-survie de l'autophagie à court terme (Fulda *et al.*, 2010). Cependant, un stress prolongé résulte en une phosphorylation constitutive d'eIF2 α et une surexpression d'IRGM régulant l'autophagie, induisant une mort cellulaire par nécrose (Roy *et al.*, 2018). En modèle murin, la phosphorylation constitutive d'eIF2 α et la surexpression d'IRGM1 (homologue d'IRGM chez l'Homme) conduisent à la mise en place d'une iléite semblable à la MC. Les patients atteints de MC présentent une augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α , de l'expression d'IRGM et de la mort cellulaire par nécrose (Roy *et al.*, 2018).

L'autophagie peut moduler la mort cellulaire programmée induite par les cytokines au niveau de l'épithélium intestinal afin de limiter l'inflammation (Matsuzawa-Ishimoto *et al.*, 2017; Pott *et al.*, 2018). L'utilisation de souris déficientes pour *Atg16l1* spécifiquement au niveau des cellules épithéliales intestinales (*Atg16l1*^{ACEI}) présentant une colite chronique induite expérimentalement a permis de montrer que l'autophagie protège les cellules épithéliales intestinales de l'apoptose induite par le TNF, permettant le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale (Matsuzawa-Ishimoto *et al.*, 2017; Pott *et al.*, 2018). La viabilité d'organoïdes intestinaux portant le variant *ATG16L1*^{T300A} en réponse au traitement par le TNF est diminuée comparativement à ceux portant l'allèle sauvage *ATG16L1* (Matsuzawa-Ishimoto *et al.*, 2017). Ces résultats suggèrent qu'une autophagie fonctionnelle est nécessaire à une réponse optimale au traitement par les anti-TNF dans le cadre des MICI.

(Suite Figure 32)

Au niveau de l'épithélium intestinal : **(A)** L'autophagie module la fonction barrière de l'épithélium en dégradant la CLDN2. Une autophagie dysfonctionnelle augmente le niveau de CLDN2 et donc la perméabilité intestinale. **(B)** Une autophagie défectueuse conduit à une dysbiose intestinale et à une augmentation de la quantité de bactéries opsonisées par les IgA. **(C)** En favorisant l'homéostasie mitochondriale, l'autophagie protège les cellules épithéliales intestinales de la mort cellulaire et prévient la perte des cellules de Paneth. Le *MIR346*, dont l'expression est induite suite à un stress du RE, augmente la traduction de *GSK3B* ce qui favorise la dissociation de BCL2 et BECN1. Par conséquent, la mitophagie est activée, réduisant le niveau de ROS. L'activation de l'inflammasome NLRP3 médiée par les ROS qui conduit à l'activation de la CASP1 et à la production d'IL1B et d'IL18 est également inhibée par la mitophagie induite par GCN2/EIF2AK4 suite à une carence en acides aminés. Une autophagie dysfonctionnelle entraîne une accumulation de mitochondries endommagées et de ROS, augmentant ainsi l'activation de l'inflammasome et l'inflammation et aggravant la mort cellulaire induite par les ROS. **(D)** NOD2 recrute ATG16L1 à la membrane plasmique au point d'entrée de la bactérie, initiant ainsi l'autophagie. L'association d'IRGM avec NOD2 augmente l'ubiquitinylation d'IRGM et l'assemblage de la machinerie autophagique, induisant la xénophagie. Les variants de risque situés dans des gènes de l'autophagie induisent un défaut de ce processus et une altération de l'élimination des bactéries intracellulaires. **(E)** La stimulation de NOD2 et des récepteurs TNF des cellules épithéliales intestinales active IKKA qui phosphoryle ATG16L1, permettant ainsi sa stabilisation et prévenant le stress du RE au cours de l'inflammation. L'inactivation d'IKKA entraîne un défaut de stabilisation d'ATG16L1, qui est alors dégradée par la CASP3, augmentant ainsi le stress du RE. **(F)** Dans les cellules de Paneth, l'activation de NOD2 en réponse aux bactéries commensales entraîne le recrutement de LRRK2, RIPK2 et RAB2A aux granules denses, un processus nécessaire à la sécrétion du lysozyme et d'autres peptides antimicrobiens. Une dysfonction de NOD2 ou de LRRK2 résulte en une dégradation du lysozyme médiée par le lysosome. **(G)** L'infection des cellules de Paneth par des bactéries invasives altère la voie de sécrétion RE-Golgi et le lysozyme est alors sécrété *via* l'autophagie sécrétoire. Ce processus nécessite l'activation de la voie EIF2AK3-EIF2A médiée par le stress du RE dans les cellules de Paneth et l'activation de la voie TLR-MYD88 dans les cellules dendritiques qui promeut la sécrétion d'IL-22 par les cellules lymphoïdes innées de type 3. Les cellules de Paneth présentant une autophagie défectueuse ne peuvent plus sécréter de lysozyme *via* l'autophagie sécrétoire. **(H)** Lors d'un stress du RE dans les cellules de Paneth, IRE1A interagit avec OPTN et est recrutée aux autophagosomes pour être dégradée. Une clairance défectueuse des agrégats d'IRE1A lors d'un stress du RE due à un défaut de l'autophagie augmente le stress du RE et conduit au développement chez la souris d'une iléite transmurale spontanée similaire à ce qui est observé dans le cas de la MC. **(I)** Dans les cellules souches intestinales, l'autophagie limite l'accumulation des ROS inhibant leur différenciation, permettant ainsi la régénération de l'épithélium. Une autophagie défectueuse conduit à une accumulation de ROS et à une altération de la régénération épithéliale (Asano *et al.*, 2017). **(J)** Dans les macrophages, en réponse à l'activation du TLR4 qui conduit à une inflammation dépendante de TRIF, l'autophagie est activée afin de contrôler le *turnover* de TRIF et de limiter la production d'IFN β 1. Une autophagie défectueuse conduit à l'accumulation de TRIF et donc à une augmentation de la production d'IFN β 1 (Samie *et al.*, 2018). En réponse à l'activation du TLR4, NF κ B active l'expression de NLRP3, du pro-IL1B et de SQSTM1. SQSTM1 favorise la mitophagie afin de prévenir l'activation de l'inflammasome NLRP3, inhibant ainsi la production d'IL1B. IRGM limite également l'activation de l'inflammasome en prévenant son assemblage et en favorisant la dégradation des composants de l'inflammasome par l'autophagie sélective. Une autophagie défectueuse conduit à une accumulation de mitochondries dysfonctionnelles et de ROS, favorisant l'activation de l'inflammasome NLRP3 et donc la production d'IL1B. **(K)** Dans les cellules dendritiques, l'autophagie dégrade les pathogènes intracellulaires et participe à la présentation des antigènes aux cellules T afin d'induire la mise en place des réponses immunes adaptatives. La mitophagie induite par GCN2/EIF2AK4 inhibe l'activation de l'inflammasome NLRP3 médiée par les ROS, diminuant ainsi la production d'IL1B et d'IL18. Une autophagie défectueuse conduit à un défaut d'élimination des bactéries et de la présentation antigénique, altérant l'activation des cellules T. L'activation des cellules T est favorisée par TAX1BP1 qui se lie à LC3 et induit l'autophagie, fournissant ainsi les nutriments essentiels à l'activation du complexe MTORC1 et induisant la transition métabolique des cellules T activées. Un défaut de l'autophagie altère la transition métabolique et la prolifération des cellules T, ce qui diminue le nombre de cellules T CD4⁺ et CD8⁺, altère le développement des cellules T mémoires, diminue la survie des Treg et augmente les réponses Th2 et Th17. **(L)** La bactérie du microbiote *Bacteroides fragilis* sécrète des molécules immunomodulatrices *via* ses OMV qui sont reconnues par le récepteur TLR2 des cellules dendritiques, activant l'autophagie associée à LC3 *via* NOD2 et ATG16L1 et induisant les cellules Treg FOXP3⁺ qui produisent de l'IL10, limitant ainsi les réponses inflammatoires médiées par les cellules T CD4⁺. Les cellules dendritiques porteuses de variants de risque dans des gènes de l'autophagie ne sont pas capables d'induire la production d'IL10 par les cellules Treg FOXP3⁺ en réponse aux OMV dérivées de *B. fragilis*.

III.5.2.3 Rôle de l'autophagie dans l'homéostasie des cellules de Paneth

L'autophagie est importante pour le développement, la maintenance et le fonctionnement des cellules de Paneth, dont le rôle principal est de produire des peptides antimicrobiens.

Des défauts de morphologie des cellules de Paneth ainsi que du nombre et de la structure des granules contenant les peptides anti-microbiens ont été observés chez des souris déficientes pour *Atg5* (Cadwell *et al.*, 2008) ou *Atg7* (Wittkopf *et al.*, 2012) spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales ou totalement déficientes pour *Atg4b* (Cabrera *et al.*, 2013) ou *Irgm* (Liu *et al.*, 2013). De même, une structure irrégulière des granules ainsi qu'une diminution de la sécrétion de peptides antimicrobiens similaires à ce qui est observé chez les patients atteints de MC homozygotes pour le variant *ATG16LI*^{T300A} ont été montrées chez des souris *Atg16l1*^{HM} élevées de manière conventionnelle ainsi que chez des souris *Atg16l1*^{HM} exemptes de pathogènes spécifiques et infectées par un norovirus entérique. Ceci suggère qu'un défaut de l'autophagie n'entraînerait des défauts dans les cellules de Paneth qu'en présence d'autres facteurs tels qu'une infection (Cadwell *et al.*, 2008, 2010). Deux études ont récemment rapporté des résultats contradictoires suite à l'observation de souris *knock-in* exprimant le variant *ATG16LI*^{T300A}. Tandis que Murthy et coauteurs n'ont rapporté aucun changement dans la morphologie des cellules de Paneth chez ces souris (Murthy *et al.*, 2014), Lassen et coauteurs ont observé le développement spontané de défauts de ces cellules (Lassen *et al.*, 2014).

La sécrétion du lysozyme par les cellules de Paneth est induite suite à l'activation de NOD2 (Zhang *et al.*, 2015a) et a été associée à l'activation de l'autophagie (Bel *et al.*, 2017). En effet, l'emballage du lysozyme dans des vésicules de sécrétion nécessite l'activation de NOD2 par le MDP dérivé des bactéries symbiotiques. Ceci permet le recrutement de NOD2, LRRK2, RIPK2 (*receptor [TNFRSF]-interacting serine-threonine kinase 2*) et RAB2A (*Ras-related protein Rab-2A*) aux vésicules de sécrétion (Wang *et al.*, 2017a; Zhang *et al.*, 2015a) (**Figure 32F**). Un dysfonctionnement de NOD2 ou LRRK2, causé par les polymorphismes associés à la MC, entraîne la dégradation du lysozyme par le lysosome (Wang *et al.*, 2017a; Zhang *et al.*, 2015a). L'autophagie joue un rôle dans le maintien de la sécrétion du lysozyme médiée par les cellules de Paneth au cours de l'infection par des pathogènes invasifs (Bel *et al.*, 2017). En effet, pour contrer les dommages à l'appareil de Golgi induits par une infection par *S. Typhimurium*, les cellules de Paneth peuvent contourner la voie de sécrétion RE-Golgi et rediriger le lysozyme vers une voie de sécrétion alternative basée sur l'autophagie (Bel *et al.*, 2017) (**Figure 32G**). L'activation de l'autophagie sécrétoire dans les cellules de Paneth requiert l'induction d'un stress du RE par les bactéries *via* la voie PERK-eIF2 α (Bel *et al.*, 2017). De plus, cette activation requiert l'activation de MYD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) dans les cellules dendritiques et la sécrétion

d'IL-22 par les cellules lymphoïdes innées (Bel *et al.*, 2017). Le variant de risque *ATG16L1*^{T300A} entraîne une perturbation de la voie de sécrétion RE-Golgi mais également de l'autophagie sécrétoire dans les cellules de Paneth en réponse à l'infection par des bactéries invasives (Bel *et al.*, 2017) (**Figure 32G**). De plus, l'utilisation de souris *Atg16l1*^{ACEI} et d'un modèle murin de MICI induite par un virus a permis de montrer que l'autophagie, en favorisant l'homéostasie mitochondriale, est essentielle pour prévenir la perte des cellules de Paneth et la mort cellulaire excessive, contribuant ainsi au maintien de la barrière intestinale (Matsuzawa-Ishimoto *et al.*, 2017) (**Figure 32C**). Enfin, la perte du gène *ATG16L2*, dont un variant a été associé à la MC dans la population Coréenne (Yang *et al.*, 2014) diminue le nombre de cellules de Paneth en modèle murin (Khor *et al.*, 2019).

La protéine IRGM/IRGM1 joue également un rôle dans la morphologie et la fonction des cellules de Paneth. En effet, les souris *irgm*^{-/-} conventionnelles présentent des altérations marquées des cellules de Paneth et notamment un développement anormal des granules de sécrétion, une diminution de l'expression de certains peptides antimicrobiens et une augmentation de la susceptibilité à la colite induite au DSS (Liu *et al.*, 2013), des anomalies très peu retrouvées chez des souris *irgm*^{-/-} exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (Rogala *et al.*, 2018). De plus, ces deux types de souris présentent un microbiote intestinal profondément différent (Rogala *et al.*, 2018). Ainsi, les conditions environnementales, en modifiant la composition du microbiote intestinal, ont un fort retentissement sur la susceptibilité génétique des cellules de Paneth et donc sur les fonctions de l'épithélium et la susceptibilité à développer une inflammation intestinale.

III.5.3 Influence de l'autophagie sur le microbiote intestinal

L'autophagie joue un rôle sur le contrôle de la composition du microbiote intestinal et une autophagie dysfonctionnelle a été associée à une dysbiose intestinale (**Figure 32B**). En effet, des souris délétées spécifiquement pour *Atg7* dans les cellules épithéliales du côlon présentent une altération de la composition du microbiote fécal associée à une augmentation du nombre de bactéries totales et un enrichissement en *Clostridium leptum*, *Eubacterium cylindroides* et *Bacteroides fragilis* comparativement aux souris contrôles sauvages (Tsuboi *et al.*, 2015). De manière similaire, comparativement aux souris sauvages, la composition du microbiote intestinal des souris *Atg5*^{ACEI} est altérée et présente notamment une diminution de la diversité microbienne comme observé chez les patients atteints de MC, et une diminution du nombre de bactéries impliquées dans le contrôle des réponses inflammatoires, telles que celles des familles *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae*, dont l'abondance est diminuée dans la MC (Yang *et al.*, 2018a). A l'inverse, les souris *Atg5*^{ACEI} présentent une augmentation du nombre de bactéries pro-inflammatoires telles que celles de la famille *Pasteurellaceae*, dont l'abondance est augmentée dans

la MC (Yang *et al.*, 2018a). De plus, les souris *Atg5^{ACEI}* présentent une diminution d'*Akkermansia muciniphila* comme rapporté dans les MICI et une augmentation de *Candidatus Athromitus*, une bactérie filamenteuse segmentée capable d'induire la différenciation des cellules T CD4⁺ naïves en Th1 et Th17 (Yang *et al.*, 2018a). Les souris *ATG16L1^{T300A}* présentent elles aussi un changement de la composition du microbiote fécal avec une augmentation de l'ordre des Bacteroidales comparativement aux souris sauvages à l'état basal (Lavoie *et al.*, 2019). Lors d'une colite induite au DSS, les souris *ATG16L1^{T300A}* présentent une altération de la composition du microbiote fécal avec une diminution du phylum *Firmicutes* et une augmentation des phyla *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* et *Cyanobacteria* comparativement aux souris sauvages (Lavoie *et al.*, 2019). Les souris gnotobiotiques *ATG16L1^{T300A}* ayant reçu des selles de patients atteints de MC active, mais pas celles ayant reçu des selles de patients atteints de RCH, présentent une composition du microbiote différente des souris contrôles, marquée par une augmentation de l'abondance des *Bacteroides* (Lavoie *et al.*, 2019). Ceci est associé à une augmentation des cellules Th1 et Th17 dans la *lamina propria* du côlon et de l'iléon sans développement d'une inflammation intestinale (Lavoie *et al.*, 2019). Ainsi, le variant de risque *ATG16L1^{T300A}* contribue à la dysbiose et au dérèglement des réponses immunes avant l'apparition des symptômes de la maladie. Cependant, l'influence du génotype de l'hôte ou de certains SNP sur la composition ou la fonction du microbiote intestinal n'est pas encore bien comprise.

Les variants associés aux MICI, et notamment ceux touchant les gènes *NOD2*, *ATG16L1* et *IRGM* peuvent influencer la composition du microbiote fécal des individus sains, alors caractérisé par une diminution de *Roseburia spp.*, une bactérie productrice de butyrate (Imhann *et al.*, 2018). Une augmentation de la quantité de bactéries opsonisées par les IgA, identifiées comme des microbes favorisant l'apparition des MICI, a été observée dans les fèces de souris présentant une déficience spécifique d'*Atg16l1* dans les cellules myéloïdes mais également chez les patients atteints de MC porteurs du variant *ATG16L1^{T300A}* (Zhang *et al.*, 2017b) (**Figure 32B**). De plus, les patients atteints de MC homozygotes pour le variant *ATG16L1^{T300A}* présentent une plus forte abondance de groupes pathosymbiotiques tels que les *Enterobacteriaceae* (principalement *Escherichia coli*), *Bacteroidaceae* (principalement *Bacteroides fragilis*) et *Fusobacteriaceae* au niveau de l'iléon inflammé comparativement aux patients homozygotes pour l'allèle *ATG16L1* sauvage (Sadaghian Sadabad *et al.*, 2015).

III.5.4 Autophagie et stress du réticulum endoplasmique

Le stress du RE est capable d'activer l'autophagie. En réponse à un stress du RE prolongé, des ions calciques sont libérés du RE et activent l'AMPK bloquant mTORC1 pour activer l'autophagie (Høyer-Hansen *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'activation de la voie IRE1 α (*inositol-*

requiring enzyme 1 α)-XBP1, ainsi que la voie PERK-EIF2 α , induisent la conversion de LC3 (LC3-I en LC3-II) et la formation de l'autophagosome en condition de stress du RE (Kouyama *et al.*, 2007; Ogata *et al.*, 2006). L'autophagie peut alors compléter la dégradation associée au RE activée lors de la réponse aux protéines mal repliées. Le stress du RE active également la signalisation ATF6-DAPK1 (*death-associated protein kinase 1*) dans les cellules épithéliales intestinales (Gade *et al.*, 2012), favorisant l'élimination des bactéries intracellulaires par l'autophagie (Lopes *et al.*, 2018). De plus, la protéine ATF6 activée stimule AKT, résultant en une inhibition de mTORC1 (Yamazaki *et al.*, 2009). Le stress du RE augmente par ailleurs le niveau du miR-346 en cellules épithéliales, augmentant le niveau de GSK3 β . Ceci favorise la dissociation de BCL2 et BECN1, promouvant ainsi l'élimination des mitochondries par l'autophagie, un processus appelé mitophagie (Guo *et al.*, 2018a) (**Figure 32C**).

En modèle murin de colite induite au DSS, l'inhibition pharmacologique ou génétique de TREM1 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 1*), connu pour amplifier l'inflammation dans de nombreuses pathologies, augmente l'autophagie *via* la dérégulation de mTOR, compensant la réponse aux protéines mal repliées pour réduire le stress du RE (Kökten *et al.*, 2018). Cela rétablit également l'homéostasie du microbiote intestinal, prévenant ainsi l'inflammation du côlon et atténuant la sévérité de la colite (Kökten *et al.*, 2018).

Une autophagie dysfonctionnelle conduit à une augmentation du stress du RE dans les cellules épithéliales intestinales murines (Tschurtschenthaler *et al.*, 2017). L'autophagie est fortement activée dans les cellules de Paneth (Adolph *et al.*, 2013) afin de contrebalancer la forte activation du stress du RE (Ogata *et al.*, 2006). Ainsi, le stress du RE est délétère lorsque l'autophagie est non fonctionnelle. Une corrélation entre la présence du variant *ATG16L1*^{T300A}, le stress du RE dans les cellules de Paneth et l'augmentation de la colonisation par les AIEC chez les patients atteints de MC a été rapportée (Deuring *et al.*, 2014). Les souris *Atg16l1*^{ACEI} développent spontanément une iléite transmurale similaire à la MC médiée par l'élimination défectueuse des agrégats IRE1- α au cours d'un stress du RE dans les cellules de Paneth (Tschurtschenthaler *et al.*, 2017). L'accumulation d'IRE1- α a également été observée dans les cryptes épithéliales intestinales de sujets sains et de patients atteints de MC homozygotes pour le variant *ATG16L1*^{T300A} (Tschurtschenthaler *et al.*, 2017) (**Figure 32G**). De plus, la stimulation des récepteurs NOD et TNF dans les cellules épithéliales intestinales d'un modèle murin de colite induite au DSS conduit à la phosphorylation d'ATG16L1 par IKK- α (*I κ B kinase α*), protégeant ainsi ATG16L1 du clivage par la caspase 3 et limitant l'activation du stress du RE (Diamanti *et al.*, 2017) (**Figure 32E**). Cependant, chez des souris exprimant une protéine IKK- α non activable spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales, la dégradation d'ATG16L1 est augmentée de manière similaire à ce qui est observé pour la protéine *ATG16L1*^{T300A}, plus sensible à la dégradation par la caspase 3

lors d'un stress cellulaire (Murthy *et al.*, 2014), conduisant à un stress du RE (Diamanti *et al.*, 2017). Ainsi, IKK- α prévient le stress du RE et l'inflammation en limitant la dégradation de la protéine ATG16L1. Enfin, en réponse au di-AMP cyclique, un PAMP des bactéries à Gram positif, la voie STING est induite et inhibe mTORC1 afin d'induire l'autophagie et limiter le stress du RE (Moretti *et al.*, 2017).

Le stress du RE et l'autophagie peuvent agir en synergie pour favoriser le développement de la MC. En effet, des souris déficientes pour *Atg16l1* et *Xbp1* spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales (*Atg16l1^{ACEI} Xbp1^{ACEI}*) développent une colite plus sévère que les souris *Atg16l1^{ACEI}* ou *Xbp1^{ACEI}* (Adolph *et al.*, 2013). Cependant, toutes ces souris, qu'elles soient déficientes pour un seul de ces gènes ou les deux, présentent une forte accumulation et une hyperactivation d'IRE1- α (Adolph *et al.*, 2013) qui serait due à un défaut de dégradation d'IRE1- α par l'autophagie (Tschurtschenthaler *et al.*, 2017). Les cellules épithéliales intestinales primaires de patients atteints de MC porteurs de plusieurs variants de risque impliqués à la fois dans l'autophagie et le stress du RE, mais pas dans l'autophagie seule, présentent une réponse au stress du RE significativement plus forte, indiquant que les prédispositions génétiques dans ces deux voies doivent être pris en considération au cours des études fonctionnelles (Vanhove *et al.*, 2018).

III.5.5 Autophagie et immunité innée

III.5.5.1 Modulation de l'activation de l'inflammasome par l'autophagie

L'autophagie est importante pour la modulation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. En particulier, l'autophagie diminue la sécrétion des cytokines IL-1 β et IL-18 associées à l'inflammasome (Saitoh *et al.*, 2008). Le lien entre des défauts de l'autophagie et une activation excessive de l'inflammasome a été associée à la production de ROS en réponse à un stress mitochondrial (Zhou *et al.*, 2011) ainsi qu'à un défaut de dégradation des inflammasomes assemblés ou des composants de la voie de l'inflammasome tels que NLRP3 et AIM2 (*absent in melanoma 2*) par les autophagosomes (Shi *et al.*, 2012). Une dysfonction de l'autophagie conduit à une activation anormale de l'inflammasome associée à une augmentation de l'activité de la caspase 1, une augmentation de la production d'IL-1 β et d'IL-18 et à une plus grande susceptibilité à développer une inflammation intestinale induite expérimentalement (Takahama *et al.*, 2018). Les souris déficientes pour *Atg16l1* spécifiquement dans les cellules de la lignée myéloïde présentent une augmentation de l'activation de la caspase-1 ainsi que de la production d'IL-1 β et d'IL-18 par les macrophages après stimulation par une endotoxine bactérienne. De plus, ces souris présentent une susceptibilité accrue au développement d'une colite induite au DSS (Saitoh *et al.*, 2008). Les souris exprimant le variant *ATG16L1^{T300A}* ou les souris délétées spécifiquement pour *Atg5* dans les macrophages présentent également une augmentation de la sécrétion d'IL-1 β médiée par

l'activation de l'inflammasome comparativement à leurs contrôles respectifs, conduisant à une sévérité plus importante de l'uvéite induite par une endotoxine, une pathologie oculaire fréquemment développée par les patients atteints de MC (Santeford *et al.*, 2016). L'inhibition de l'inflammasome médiée par l'autophagie serait un nouveau mécanisme sous-tendant le rôle de GCN2/EIF2AK4 dans le contrôle de l'inflammation intestinale (Ravindran *et al.*, 2016). En effet, suite à une carence en acides aminés, l'activation de GCN2 active l'autophagie afin de diminuer l'activation de l'inflammasome due à l'augmentation du niveau de ROS mitochondriaux dans les cellules épithéliales intestinales, inhibant ainsi l'inflammation et protégeant les souris de la colite induite au DSS (Ravindran *et al.*, 2016) (**Figure 32K**). Un défaut de *Gcn2* spécifiquement dans les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) CD11c⁺ ou les cellules épithéliales intestinales résulte en un défaut d'activation de l'autophagie, conduisant à une augmentation du niveau de ROS mitochondriaux et à une augmentation de la susceptibilité à la colite induite au DSS (Ravindran *et al.*, 2016).

Récemment, les gènes de susceptibilité à développer la MC *PTPN2* et *PTPN22* ont été impliqués dans la régulation de l'autophagie et de l'activité de l'inflammasome (Spalinger *et al.*, 2017, 2018). *PTPN22* déphosphoryle l'inflammasome NLRP3 afin de limiter la séquestration de NLRP3 dans les autophagosomes et leur dégradation par les autolysosomes (Spalinger *et al.*, 2017) (**Figure 32J**). Dans les macrophages humains et les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris, la perte de *PTPN22* conduit à une augmentation de la phosphorylation de NLRP3 puis à sa dégradation, diminuant ainsi la sécrétion d'IL-1 β (Spalinger *et al.*, 2017). La perte d'une autophagie fonctionnelle permet de contrer la réduction de l'activation de NLRP3 observée dans les cellules déficientes pour *PTPN22* entraînant une augmentation de la sécrétion d'IL-1 β (Spalinger *et al.*, 2017) (**Figure 32J**). *PTPN2*, impliqué dans la régulation de l'autophagie, module l'activation de l'inflammasome et la sécrétion d'IL-1 β en limitant la phosphorylation de l'adaptateur moléculaire ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), nécessaire à l'assemblage de l'inflammasome. Il a été rapporté qu'un variant associé à une perte de fonction de *PTPN2* est un facteur de risque pour la MC tandis qu'un variant associé à un gain de fonction de *PTPN2* est un facteur protecteur contre la MC (Pike and Tremblay, 2018). Chez les souris, la perte de *Ptpn2* dans les cellules myéloïdes augmente légèrement la susceptibilité à la colite induite au DSS en raison d'une augmentation de l'assemblage de l'inflammasome et de la production d'IL-1 β (Spalinger *et al.*, 2018) (**Figure 32J**).

L'activation de l'autophagie et de l'inflammasome ont été récemment associées *via* le régulateur inflammatoire clé NF- κ B. En effet, NF- κ B active l'expression du récepteur autophagique p62, favorisant l'élimination des mitochondries endommagées sécrétant des signaux activateurs du NLRP3 par la mitophagie, inhibant ainsi l'activation de l'inflammasome et la production d'IL-1 β

(Zhong *et al.*, 2016) (**Figure 32J**). IRGM/IRGM1 joue un rôle anti-inflammatoire *via* la suppression de l'activation de l'inflammasome NLRP3 en prévenant d'une part son assemblage et en favorisant d'autre part la dégradation de ses composants par l'autophagie sélective dépendante de p62, limitant ainsi la mort cellulaire induite par l'inflammation et supprimant la colite induite au DSS (Mehto *et al.*, 2019) (**Figure 32J**). Ainsi, IRGM est directement impliqué dans la suppression de l'inflammation, tandis que le variant de risque du gène IRGM ne pourrait plus prévenir l'inflammation.

III.5.5.2 Xénophagie et MC

Le variant *NOD2*^{L1007fsinsC} est incapable de détecter le MDP bactérien, résultant en un défaut d'activation de la voie NF-κB et de la sécrétion de peptides anti-microbiens. Les souris *Atg1611*^{HM} conventionnelles ne développent pas spontanément d'inflammation intestinale mais présentent une dysfonction des cellules de Paneth similaire à ce qui est observé chez les patients atteints de MC porteurs du variant *ATG16L1*^{T300A} (Cadwell *et al.*, 2008). De plus, l'infection des souris *Atg1611*^{HM} exemples de pathogène spécifiques par un norovirus murin entraîne des défauts de structure et de formation des granules dans les cellules de Paneth similaires à ce qui est observé chez les patients atteints de MC homozygotes pour l'allèle de risque *ATG16L1*^{T300A} (Cadwell *et al.*, 2010). De plus, suite à un traitement au DSS, ces souris présentent une colite plus sévère que les animaux contrôles (Cadwell *et al.*, 2010). Ces changements ne sont observés ni chez les souris contrôles non infectées, ni chez les patients homozygotes pour l'allèle *ATG16L1* sauvage, suggérant que certains facteurs génétiques ne peuvent influencer le développement de la MC qu'en association avec un facteur infectieux.

La majorité des études fonctionnelles se sont intéressées à *NOD2* et *ATG16L1*, qui sont codés par deux facteurs de risque majeurs de la MC. Ces études ont rapporté une diminution de l'autophagie dans différents types cellulaires de patients atteints de MC. Les cellules portant les variants *NOD2*^{L1007fsinsC} ou *ATG16L1*^{T300A} présentent une dérégulation des fonctions associées à l'autophagie telles qu'un défaut de formation des autophagosomes et de la dégradation des micro-organismes, un défaut de présentation des antigènes bactériens aux cellules T CD4⁺ et une altération de la formation des granules dans les cellules de Paneth (Iida *et al.*, 2018). De plus, l'induction de l'autophagie par le MDP est fortement diminuée dans les cellules dendritiques et les cellules épithéliales intestinales porteuses des variants *NOD2*^{L1007fsinsC} ou *ATG16L1*^{T300A}, conduisant à un défaut d'élimination des bactéries pathogènes telles que *Salmonella* Typhimurium, *Shigella flexneri* et les AIEC (Cooney *et al.*, 2010). Cela serait dû à l'incapacité du variant *NOD2*^{L1007fsinsC} à recruter *ATG16L1* au site d'entrée de la bactérie. Une autophagie fonctionnelle est également requise pour

la présentation des antigènes dérivés des bactéries dégradées aux composants du système immunitaire adaptatif (Deretic *et al.*, 2013). Le variant *ATG16L1*^{T300A} conduit à des défauts de l'induction de l'autophagie, du trafic bactérien et de l'apprêtement et la présentation des antigènes dans les cellules dendritiques (Lapaquette *et al.*, 2017). Les macrophages murins primaires déficients pour *Atg16l1* et les macrophages primaires humains porteurs du variant *ATG16L1*^{T300A} présentent une augmentation de production de ROS, une mitophagie défectueuse et une diminution de la fusion des vésicules contenant *S. Typhimurium* avec les lysosomes positifs pour LAMP1 conduisant à une clairance bactérienne défectueuse et une diminution de la présentation antigénique par le CMH de classe II (Zhang *et al.*, 2017b).

Le variant de risque *IRGM*^{C313T} entraîne une perte de contrôle de l'expression d'IRGM par le miR-196, avec par conséquent une xénophagie défectueuse et une réplication intracellulaire anormale des AIEC (Brest *et al.*, 2011). Il a ensuite été montré qu'IRGM interagit avec ULK1 et le complexe Beclin 1 afin de favoriser leur co-assemblage, mais également avec NOD2 et ATG16L1 afin de former un complexe moléculaire et moduler l'autophagie en réponse à des composants microbiens. NOD2 favorise la poly-ubiquitinylation d'IRGM, une étape nécessaire à l'interaction d'IRGM avec les facteurs autophagiques et l'élimination des bactéries (Chauhan *et al.*, 2015) (**Figure 32D**). Récemment, il a été rapporté que suite à une infection par *Salmonella*, ULK1 active ATG16L1 par phosphorylation, permettant ainsi la localisation d'ATG16L1 au site d'entrée de la bactérie, cependant, la phosphorylation du variant de risque *ATG16L1*^{T300A} par ULK1 induit sa déstabilisation et favorise sa dégradation, diminuant ainsi la xénophagie (Alsaadi *et al.*, 2019).

Les récepteurs de la xénophagie, tels que p62 ou l'OPTN, sont nécessaires à l'élimination des pathogènes. Bien que peu d'études se soient intéressées à p62 dans la pathogenèse de la MC, un défaut de l'autophagie associé à une diminution du recyclage de p62 a été observé au cours de l'inflammation intestinale (Cosin-Roger *et al.*, 2017). De plus, l'expression de p62 est supérieure dans les cellules épithéliales de la muqueuse endommagée par rapport à la muqueuse non endommagée de patients atteints de MICI (Ortiz-Masiá *et al.*, 2014). En cellules épithéliales intestinales, la survie des AIEC LF82 est supérieure dans les cellules transfectées avec un vecteur permettant l'expression d'un shRNA (*small hairpin RNA*) inhibant p62 par rapport à celles transfectées avec un vecteur vide (Mimouna *et al.*, 2014).

Le gène codant l'OPTN est sous exprimé dans les macrophages chez environ 10 % des patients atteints de MC, et ceci est associé à une diminution du niveau de protéine OPTN et une diminution de la sécrétion de cytokines par les macrophages suite à une infection bactérienne (Smith *et al.*, 2015). Les macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris déficientes pour *Optn* présentent une diminution de leur capacité à sécréter du TNF et de l'IL-6 suite à une stimulation

par des *E. coli* inactivées à la chaleur, en raison de la redirection par erreur de ces cytokines vers les lysosomes (Chew *et al.*, 2015). Les souris déficientes pour *Optn* présentent une colite induite par *Citrobacter rodentium* plus sévère, une diminution du niveau de TNF dans le sérum et un défaut de recrutement des neutrophiles au site de l'infection comparativement aux souris sauvages (Chew *et al.*, 2015).

Enfin, une fois ciblés, les pathogènes doivent être éliminés par fusion de l'autophagosome avec les lysosomes. Les protéines inhibitrices de l'apoptose, telles que cIAP2 et XIAP, sont nécessaires à la fusion de l'autophagosome avec le lysosome au cours de l'autophagie (Gradzka *et al.*, 2018). L'inhibition ou la perte de fonction de ces protéines résulte en une altération du flux autophagique responsable d'une mitophagie et d'une xénophagie défectueuses, ainsi que d'une augmentation de la sécrétion de TNF et d'IL-1 β , pouvant conduire au développement de la MC (Gradzka *et al.*, 2018). De plus, l'élimination des pathogènes requiert un lysosome fonctionnel. L'acidité du lysosome, nécessaire à son fonctionnement, est contrôlée par le récepteur GPR65 (*G protein-coupled receptor 65*) (Lassen *et al.*, 2016). Les cellules épithéliales ou les lymphoblastes de patients atteints de MICI porteurs du variant de risque *GPR65*^{I231L} présentent une acidification lysosomale aberrante entraînant un dysfonctionnement lysosomal et une altération de la clairance bactérienne intracellulaire par l'autophagie (Lassen *et al.*, 2016). En modèle murin, la délétion de *gpr65* augmente la susceptibilité des souris au développement d'une pathologie intestinale induite par *C. rodentium* (Lassen *et al.*, 2016). Cependant, d'autres études ont rapporté qu'un défaut de l'autophagie augmente la résistance à l'infection par *C. rodentium* (Marchiando *et al.*, 2013; Martin *et al.*, 2018). En effet, comparativement aux souris sauvages, les souris *Atg1611*^{HM} présentent une réponse immunitaire renforcée dépendante des monocytes et de NOD2 ainsi qu'une réponse accrue de l'IFN-I au microbiote intestinal, augmentant leur résistance à l'infection par *C. rodentium* (Marchiando *et al.*, 2013). A l'inverse, les souris déficientes pour *Atg1611* spécifiquement dans les cellules myéloïdes sont sensibles à cette infection, indiquant que les cellules myéloïdes sont nécessaires à la protection contre *C. rodentium* médiée par l'autophagie (Martin *et al.*, 2018). Ces études suggèrent que des variants de gènes associés à l'autophagie pourraient conférer à l'hôte une protection contre certaines infections par des agents pathogènes.

III.5.6 Autophagie et immunité adaptative

III.5.6.1 Autophagie et présentation antigénique

Une autophagie dysfonctionnelle interfère avec l'apprêtement des antigènes et leur présentation aux lymphocytes *via* le CMH-II par les cellules dendritiques, comme démontré en modèle murin déficient pour *Atg5* spécifiquement dans les cellules dendritiques (Lee *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2013). L'autophagie médiée par NOD2 dans les cellules dendritiques est nécessaire à

l'élimination des AIEC intracellulaires et à la génération des réponses des cellules T CD4⁺ spécifiques des antigènes présentés par le CMH-II (Cooney *et al.*, 2010). Les cellules dendritiques des patients atteints de MC porteurs d'un allèle à risque *NOD2*^{L1007fsinsC} ou *ATG16LI*^{T300A} sont défectueuses pour la présentation antigénique *via* le CMH-II (Cooney *et al.*, 2010). De plus, l'autophagie module négativement les réponses adaptatives en déstabilisant la synapse immunologique, c'est-à-dire le site de contact entre les cellules T et les cellules dendritiques (Wildenberg *et al.*, 2012). La délétion d'*Atg16l1* ou d'*Irgm1* dans les cellules dendritiques de souris résulte en une interaction hyperstable entre les cellules dendritiques et les cellules T, une augmentation de l'activation des cellules T et l'activation d'une réponse Th17 (Wildenberg *et al.*, 2012). Les cellules dendritiques des patients Crohn porteurs de l'allèle *ATG16LI*^{T300A} présentent une interaction hyperstable similaire avec les cellules T (Wildenberg *et al.*, 2012). Ainsi, les variants associés aux MICI dans les gènes de l'autophagie peuvent entraîner une dérégulation de l'immunité adaptative, favorisant le développement de la maladie.

III.5.6.2 Autophagie et activation des cellules T

Les cellules T sont très sensibles aux altérations du processus autophagique (Ma *et al.*, 2013). En effet, les souris présentant une autophagie défectueuse spécifiquement dans les cellules T présentent une diminution du nombre de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ et une altération de la prolifération des cellules T, révélant le rôle clé de l'autophagie dans l'homéostasie de ces cellules (Kabat *et al.*, 2016) (**Figure 32K**). De plus, l'autophagie contribue substantiellement à la survie des cellules T CD8⁺ et à la formation des cellules T mémoire (Xu *et al.*, 2014) (**Figure 32K**). L'autophagie médiée par le récepteur TAX1BP1 est impliquée dans le contrôle du métabolisme cellulaire permettant l'activation des cellules T, révélant la relation cruciale entre l'activation immune, l'autophagie et le métabolisme des cellules immunitaires (Whang *et al.*, 2017) (**Figure 32K**). Les cellules Th jouent un rôle critique dans les réponses immunitaires intestinales et leur nombre et comportement varient au cours des MICI (Geremia *et al.*, 2014). L'autophagie favorise la survie des cellules Treg et limite l'expansion des lymphocytes Th2 pro-inflammatoires. L'inhibition de l'autophagie spécifiquement dans les cellules T modifie la balance entre les différents types de lymphocytes Th dans l'intestin (Kabat *et al.*, 2016). Les souris déficientes pour *Atg16l1* dans les cellules T CD4⁺ développent spontanément une inflammation intestinale caractérisée par une réponse Th2 contre les antigènes alimentaires et microbiens et par une perte des Treg, suggérant que l'autophagie permet la survie des Treg et la limitation de l'expansion et donc de l'inflammation médiée par les lymphocytes Th2 (Kabat *et al.*, 2016) (**Figure 32K**). De plus, les souris gnotobiotiques exprimant le variant *ATG16LI*^{T300A} et ayant reçu des selles de patient atteint de MC active, mais pas celles ayant reçu des selles de patient atteint de RCH active,

présentent une augmentation des réponses Th1 et Th17 au niveau de l'intestin ainsi qu'une augmentation de *Bacteroides ovatus*, une bactérie augmentant elle aussi les réponses Th17 chez ces souris (Lavoie *et al.*, 2019). Les souris déficientes pour *Gcn2* spécifiquement dans les CPA ou les cellules épithéliales intestinales présentent une réponse Th17 exacerbée, une augmentation de l'activation de l'inflammasome et de la production d'IL-1 β (Ravindran *et al.*, 2016) (**Figure 32K**).

Enfin, une autophagie fonctionnelle est nécessaire pour la reconnaissance des signaux protecteurs dérivés du microbiote intestinal pour initier une réponse immunitaire efficace et inhiber l'inflammation intestinale (Chu *et al.*, 2016). En effet, la bactérie commensale *B. fragilis* sécrète dans ses OMV une molécule immunomodulatoire, le polysaccharide A (PSA), reconnue par les cellules dendritiques *via* le TLR2 (Shen *et al.*, 2012), ce qui augmente alors la conversion des cellules T CD4⁺ naïves en cellules Treg FOXP3⁺ produisant de l'IL-10 et protège les souris d'une colite expérimentale (Shen *et al.*, 2012). Les OMV nécessitent ATG16L1 et NOD2 pour activer l'autophagie associée à LC3 dans les cellules dendritiques murines dérivées de la moelle osseuse (Chu *et al.*, 2016) (**Figure 32L**). Lors de l'administration orale d'OMV, alors que les souris sauvages sont protégées de l'induction d'une colite à l'acide 2,4-dinitrobenzènesulfonique, les souris déficientes pour *Atg16l1* spécifiquement dans les cellules dendritiques CD11⁺ présentent une perte de poids accrue et une mortalité élevée de manière similaire à celles observées chez les souris n'ayant pas reçu les OMV (Chu *et al.*, 2016). De plus, la production d'IL-10 par les cellules Treg CD4⁺ FOXP3⁺ est significativement diminuée chez les souris déficientes pour *Atg16l1* spécifiquement dans les cellules dendritiques CD11⁺ comparativement aux souris sauvages (Chu *et al.*, 2016). Les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris déficientes pour *Nod2* sont également incapables d'activer la production d'IL-10 par les cellules Treg FOXP3⁺ en réponse aux OMV dérivées de *B. fragilis* en co-culture *in vitro* (Chu *et al.*, 2016). Pour finir, contrairement aux cellules de patients portant l'allèle sauvage, les cellules dendritiques dérivées des monocytes de patients atteints de MC ou de sujets sains homozygotes pour le variant *ATG16LI*^{T300A} pulsées avec les OMV de *B. fragilis* et co-cultivées avec les cellules T CD4⁺ syngéniques ne sont pas capables d'induire la production d'IL-10 par les cellules Treg FOXP3⁺ (Chu *et al.*, 2016) (**Figure 32L**).

III.5.7 Autophagie : vers des thérapies potentielles pour la MC

Le traitement par l'analogue de la rapamycine, l'évérolimus, un inducteur de l'autophagie, améliore l'iléite chez des souris *il10*^{-/-} (Matsuda *et al.*, 2007). Chez les patients, les résultats concernant l'évérolimus sont contradictoires. Bien qu'une équipe ait rapporté une amélioration des symptômes chez un patient atteint de MC (Dumortier *et al.*, 2008) une étude multicentrique randomisée ne démontre aucun effet supérieur de la molécule comparativement à un placebo

(Reinisch *et al.*, 2008). Le sirolimus, un autre analogue de la rapamycine semble être une thérapie efficace permettant d'induire une rémission clinique et une guérison de la muqueuse chez les enfants atteints de MICI sévère et réfractaire (Mutalib *et al.*, 2014). Cependant, dans ces contextes, les effets bénéfiques des analogues de la rapamycine peuvent être dus à des effets immunosuppresseurs indépendants de l'autophagie. Ainsi, l'utilisation de modulateurs de l'autophagie en tant que thérapie demeure problématique en raison de leur faible spécificité pour leurs cibles, l'absence de spécificité pour un type cellulaire particulier et leurs effets indépendants de l'autophagie.

Ainsi, des stratégies permettant de moduler spécifiquement l'autophagie sans effet toxique restent à développer afin d'établir une thérapie efficace pour le traitement des MICI. De manière intéressante, certains composés dérivés de produits alimentaires, tels que la vitamine D et la curcumine, peuvent activer l'autophagie. En effet, le traitement des cellules épithéliales intestinales à la vitamine D3 augmente l'activation de l'autophagie (Wu *et al.*, 2015a), suggérant qu'une complémentation en vitamine D chez les patients atteints de MC pourrait pallier leur carence et augmenter le niveau de l'autophagie. De même, la glutamine active l'autophagie dans les cellules épithéliales intestinales à la fois en conditions basales et en conditions de stress en régulant les voies mTOR et MAPK/p38, limitant ainsi l'apoptose induite par le stress (Sakiyama *et al.*, 2009). Le traitement par la curcumine permet d'améliorer la pathologie intestinale en modèle animal de MICI (Yue *et al.*, 2019) en inhibant l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Gong *et al.*, 2018) et lors d'études cliniques (Yanai *et al.*, 2016). Un autre extrait végétal, le célastol extrait de la racine de *Tripterygium wilfordii* utilisée traditionnellement en médecine chinoise, augmente l'autophagie en inhibant la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR dans le côlon de souris *il10^{-/-}* limitant ainsi l'inflammation (Zhao *et al.*, 2015). L'andrographolide (Guo *et al.*, 2014) et la palmatine (Mai *et al.*, 2019), deux extraits végétaux, favorisent la mitophagie dans les macrophages, inhibant l'inflammasome NLRP3 et améliorant la colite induite au DSS. Enfin, l'induction de la xénophagie par le resvératrol dans les cellules épithéliales intestinales et les macrophages favorise la clairance de *Salmonella Typhimurium* et des AIEC *in vitro* et en modèle de poisson zèbre (Al Azzaz *et al.*, 2019). D'autres traitements basés sur la modulation de l'autophagie et de l'inflammasome ont été étudiés. Un agoniste du CNR2 (*Cannabinoid receptor 2*), un récepteur couplé aux protéines G retrouvé principalement sur les cellules immunitaires, permet d'augmenter l'autophagie, inhibant en retour l'activation de l'inflammasome NLRP3 et atténuant la colite induite au DSS en modèle murin (Shao *et al.*, 2014). A l'inverse, l'inhibition de l'inflammasome pourrait être une stratégie intéressante pour favoriser l'activation de l'autophagie. L'administration de Ginsenoside Rd, une molécule anti-inflammatoire, permet d'inactiver l'inflammasome NLRP3, activant la mitophagie médiée par p62, conduisant à une amélioration de la colite induite au DSS en modèle murin (Liu *et al.*, 2018a).

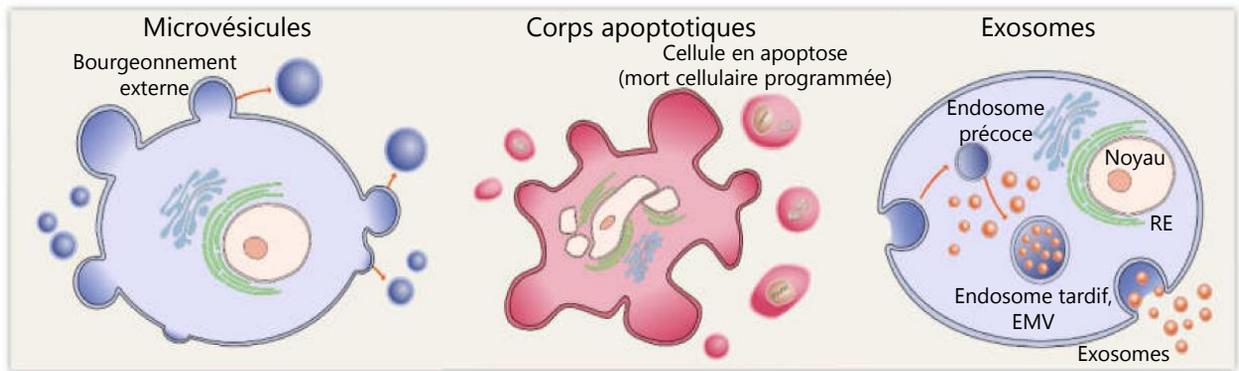


Figure 33 : Représentation schématique des principales vésicules extracellulaires.

Plusieurs types de vésicules sont libérées par les cellules, notamment les microvésicules, les corps apoptotiques et les exosomes (modifiée d'après Gurunthan *et al.*, 2019).

Tableau 8 : Caractéristiques physico-chimiques des principaux types de vésicules extracellulaires.

^aLes données sont basées sur l'observation de préparations pures de vésicules. Cependant, en pratique, chaque préparation de vésicules est hétérogène, reposant sur différents protocoles permettant l'enrichissement d'un type de vésicule plus qu'un autre. Les vésicules peuvent être classées selon la présence de plusieurs (mais pas nécessairement de la totalité) des caractéristiques listées dans ce tableau. Adapté d'après Zhang *et al.*, 2019.

Caractéristique ^a	Exosomes	Microvésicules	Corps apoptotiques
Origine intracellulaire	Fusion des corps multivésiculaires avec la membrane plasmique	Bourgeoisement externe direct de la membrane plasmique	Débris cellulaires, bourgeoisement de la membrane plasmique au cours de l'apoptose
Taille	30-100 nm	100-1000 nm	1000-5000 nm
Contenu	Protéines, lipides, différentes espèces d'ARN et ADN	Protéines, lipides, différentes espèces d'ARN et ADN	Contenu cytosolique (protéines, ARN, ADN fragmenté) et organelles cellulaires
Marqueurs protéiques principaux	Tétraspansines (CD9, CD63, CD81), HSP70, HSP90, TSG101, Alix	Intégrines, sélectine, ligand CD40, flotilline-2	Histones, Annexine V
Marqueurs lipidiques principaux	Cholestérol, sphingomyéline, céramides, radeaux lipidiques, phosphatidylsérine	Externalisation de la phosphatidylsérine	Similaire à la cellule parentale
Références	Théry <i>et al.</i> , 2006	Heijnen <i>et al.</i> , 1999	Théry <i>et al.</i> , 2001

Puisque l'étiologie de la MC est multifactorielle et que les facteurs de risque sous-jacents et la physiopathologie sont spécifiques à chaque patient, le développement d'une approche personnalisée pour le traitement de la maladie semble essentiel. L'induction de l'autophagie chez les patients atteints de MC présentant des défauts génétiques associés à l'autophagie pour restaurer la sécrétion des peptides anti-microbiens par les cellules de Paneth et pour permettre l'activation de réponses immunitaires efficaces serait un concept thérapeutique intéressant (Nys *et al.*, 2013). La thérapie génique est également une stratégie thérapeutique à explorer pour soulager, mais aussi traiter la MC. Plusieurs miARN suppriment l'autophagie en inhibant l'expression de gènes associés à ce processus (El-Khider and McDonald, 2016). Nous avons pu montrer *in vitro* et *in vivo* que l'inhibition des miR-30c et miR-130a dans les cellules épithéliales intestinales abolit l'inhibition de l'autophagie médiée par les AIEC, rétablissant une clairance efficace des AIEC et inhibant l'inflammation intestinale (Nguyen *et al.*, 2014). Cibler ces miARN pourrait être une stratégie pour traiter spécifiquement les patients Crohn présentant une colonisation anormale par les AIEC. L'utilisation d'un peptide inducteur de l'autophagie appelé « Tat- BECN1 » pouvant être internalisé et induire l'autophagie dans différents types cellulaires humains permettrait également de traiter les pathologies humaines associées à une autophagie défectueuse (Shoji-Kawata *et al.*, 2013). Cependant l'utilisation de peptides inducteurs de l'autophagie ou de thérapie basée sur les miARN demeure problématique et nécessite le développement de systèmes de délivrance spécifique de l'intestin ainsi que la vérification de leur efficacité et de leur innocuité.

IV. Les Exosomes

IV.1 Généralités

Les vésicules extracellulaires ont été observées pour la première fois en 1967 par Wolf et décrites comme des débris de plaquettes (Wolf, 1967) avant d'être observées dans tous les fluides biologiques et compartiments extracellulaires testés ainsi que dans le surnageant de culture de nombreuses lignées cellulaires (Yáñez-Mó *et al.*, 2015). Trois principaux types de vésicules extracellulaires ont été décrites selon leur mécanisme de libération et leur taille (**Figure 33 et Tableau 8**) : les microvésicules, de 100 à 1000 nm de diamètre, produites par bourgeonnement externe de la membrane plasmique et détachement des vésicules, les corps apoptotiques, de 50 à 500 nm, spécifiquement libérés par les cellules en apoptose, et les exosomes, de 30 à 100 nm, produits sous formes de vésicules intra-luminales lors du bourgeonnement inverse de la membrane des EMV et libérés lors de la fusion de ces endosomes avec la membrane plasmique (Akers *et al.*, 2013). Le processus de formation des exosomes a été visualisé pour la première fois en 1983 dans des réticulocytes de rat (Harding *et al.*, 1983) puis en 1985 dans des réticulocytes de mouton (Pan

Tableau 9 : Principales méthodes de purification des vésicules extracellulaires.D'après Chiriaco *et al.*, 2018.

Méthode de purification	Principe de la purification	Avantages	Inconvénients
Centrifugation différentielle avec ou sans gradient de densité	Séparation des vésicules extracellulaires selon leur taille, leur densité et leur forme	<ul style="list-style-type: none"> - Utilisation répandue - Enrichissement des vésicules sous forme de culot - Protocole standardisé - Possibilité d'isoler des sous-types de vésicules en centrifugation par gradient de densité 	<ul style="list-style-type: none"> - Aggrégation des vésicules - Contamination par des protéines et des facteurs solubles - Faible rendement - Protocole laborieux
Précipitation à l'aide de polymères	Séparation des vésicules extracellulaires à l'aide de polymères altérant leur solubilité ou leur dispersibilité, facilitant ainsi leur précipitation	<ul style="list-style-type: none"> - Efficace à partir de peu de matériel - Fort rendement - Facile et à moindre coût - Préservation de la bioactivité 	<ul style="list-style-type: none"> - Co-précipitation de contaminants protéiques et de matériels polymériques - Peu adapté à des études à grande échelle - Temps d'incubation long
Chromatographie d'exclusion de taille	Séparation des vésicules par chromatographie par filtration sur gel en fonction de leur taille	<ul style="list-style-type: none"> - Peu coûteux - Préservation de l'intégrité et de l'activité - Fort rendement et grande pureté - Reproductible 	<ul style="list-style-type: none"> - Equipement spécifique nécessaire - Peu adapté à des études à grande échelle - Temps de purification long
Capture par immunoaffinité	Immuno-purification des vésicules en utilisant des billes magnétiques conjuguées à des anticorps dirigés contre des marqueurs de surface spécifiques des exosomes	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilité - Spécificité - Grande pureté - Possibilité d'isoler des sous-types de vésicules extracellulaires 	<ul style="list-style-type: none"> - Coûteux - Réactivité croisée des anticorps - Faible rendement
Dispositifs microfluidiques	Isolement à petite échelle basée sur une variété de propriété des exosomes telles que leur immunoaffinité, leur taille et leur densité	<ul style="list-style-type: none"> - Rapide - Peu coûteux - Automatisation facile - Grande portabilité 	<ul style="list-style-type: none"> - Manque de méthode de validation - Moyenne à faible capacité pour l'échantillon - Manque de standardisation et de tests à grande échelle sur des échantillons cliniques

et al., 1985), mais ce n'est qu'en 1987 que le nom d'« exosomes » leur a été attribué (Johnstone *et al.*, 1987).

Initialement, les exosomes ont été présentés comme des déchets cellulaires (Johnstone *et al.*, 1987), une idée supportée par de récentes études suggérant que les exosomes seraient une voie alternative pour l'élimination des déchets permettant le maintien de l'homéostasie cellulaire (Baixauli *et al.*, 2014; Hessvik *et al.*, 2016). De plus, ces vésicules jouent un rôle dans la communication intercellulaire et ont été associées à de nombreuses fonctions physiologiques et pathologiques (Arenaccio and Federico, 2017). En effet, les exosomes contiennent différentes molécules telles que des enzymes leur permettant de remodeler le milieu extracellulaire, des protéines de surface leur permettant d'agir sur les cellules voisines en activant des voies de signalisation mais également des acides nucléiques et des protéines pouvant être transférés aux cellules réceptrices (McKelvey *et al.*, 2015). Bien que libérés de manière constitutive en conditions physiologiques, leur sécrétion peut être augmentée lors de la différenciation ou de l'activation cellulaire, suite à une infection, mais également dans les cas de cancers ou de maladies inflammatoires et peut avoir une influence sur les réponses immunitaires (Arenaccio and Federico, 2017). Ainsi, en plus de leur importance en tant que vecteurs de signalisation au cours de la communication intercellulaire et la régulation, les exosomes offrent de nouvelles pistes pour l'amélioration des réponses immunes face aux pathogènes, le diagnostic et le traitement de différentes pathologies.

IV.2 Isolement et caractérisation des exosomes

L'isolement des exosomes à partir de fluides biologiques ou de surnageant de cellules en culture peut être réalisé par différentes méthodes (**Tableau 9**). Cependant, aucun consensus n'a pu être établi quant à la méthode à privilégier puisqu'aucune d'entre elles ne garantit à 100 % la séparation des exosomes des autres types de vésicules (Soares Martins *et al.*, 2018). L'ultracentrifugation est la méthode la plus communément utilisée et permet l'obtention d'exosomes relativement purs mais cette procédure longue nécessite de posséder l'équipement approprié et semble peu reproductible entre les laboratoires (Li *et al.*, 2017). De plus, le rendement en exosomes est faible et l'isolement à partir de certains fluides biologiques nécessite une centrifugation à très haute vitesse sur une longue période, compromettant l'intégrité des exosomes (Momen-Heravi *et al.*, 2012). De nombreuses autres méthodes d'isolement des exosomes existent telles que la filtration, la chromatographie d'exclusion de taille, l'isolement par immuno-affinité, l'utilisation de dispositifs microfluidiques, l'isolement par gradient de densité ainsi que l'utilisation de réactifs commerciaux basés sur l'utilisation de polymères (Li *et al.*, 2017). La chromatographie d'exclusion de taille résultant en différentes fractions de vésicules permet l'obtention d'exosomes purs, cependant les exosomes obtenus sont forcément dilués et ces procédures sont relativement

Tableau 10 : Principales méthodes d'analyse des vésicules extracellulaires.D'après Chiriaco *et al.*, 2018.

Méthode de caractérisation	Information obtenue	Avantages	Inconvénients
Microscopie électronique	Taille et morphologie des exosomes	<ul style="list-style-type: none"> - Observation directe de la taille et de la morphologie - Efficace à partir de peu de matériel - Utilisation d'anticorps spécifiques des marqueurs exosomaux 	<ul style="list-style-type: none"> - Modifications possibles de la taille et de la morphologie dues à la préparation de l'échantillon - Procédure longue
Microscopie à force atomique	Topographie tridimensionnelle des exosomes	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de fixation ni de coloration de l'échantillon - Efficace à partir de peu de matériel 	<ul style="list-style-type: none"> - Modifications possibles de la taille et de la morphologie dues à la deshydratation de l'échantillon sur mica
Analyse par diffraction de la lumière	Distribution de la taille des exosomes	<ul style="list-style-type: none"> - Préservation de l'échantillon pour les analyses en aval - Rapide - Pas de préparation de l'échantillon 	<ul style="list-style-type: none"> - Imprécis si les échantillons sont de taille hétérogène
Suivi individuel des nanoparticules	Concentration et distribution de la taille des exosomes	<ul style="list-style-type: none"> - Préservation de l'échantillon pour les analyses en aval - Rapide - Pas de préparation de l'échantillon 	<ul style="list-style-type: none"> - Imprécis si les échantillons sont de taille hétérogène ou en cas d'agrégats de particules
Détection des pulsations de résistance	Concentration, distribution de la taille et charge des EV	<ul style="list-style-type: none"> - Rapide - Pas de préparation de l'échantillon 	<ul style="list-style-type: none"> - Difficile si la taille des particules est inconnue et hétérogène - Détection de matériel non vésiculaires de taille similaire
Cytométrie en flux	Caractérisation des marqueurs exosomaux et dénombrement absolu	<ul style="list-style-type: none"> - Caractérisation quantitative et qualitative 	<ul style="list-style-type: none"> - Limite de détection dépendante du cytomètre en flux - Détection de plusieurs vésicules comme un seul événement - Détection des agrégats protéiques
ELISA/western blot	Quantification des protéines exosomales	<ul style="list-style-type: none"> - Méthodes immunologiques standard - Caractérisation spécifique des marqueurs protéiques exosomaux 	<ul style="list-style-type: none"> - Détection possible de protéines non exosomales - Pas d'informations spécifiques sur la concentration, la taille et la distribution des exosomes - Procédure longue

longues (Li *et al.*, 2017). Les solutions commerciales basées sur l'utilisation de polymères offrent une méthode d'isolement facile et rapide des exosomes par centrifugation à faible vitesse ne nécessitant aucun équipement spécialisé et ayant un bon rendement, mais peuvent parfois interférer avec les analyses réalisées en aval (Li *et al.*, 2017). Enfin, quelques équipes s'attellent à adapter les techniques de purification des exosomes existantes aux technologies de « laboratoire sur puce » permettant une consommation moindre d'échantillon par analyse, une réduction des coûts comparativement à celui des équipements de paillasse nécessaires, mais également une automatisation des analyses permettant de meilleures performances et une plus grande précision adaptable aux tests cliniques, favorisant ainsi le développement des thérapies personnalisées (Chiriaco *et al.*, 2018).

Les exosomes peuvent être visualisés et caractérisés par différentes techniques physiques ou biochimiques (**Tableau 10**). Etant donné la petite taille des exosomes, la microscopie électronique (ME) à transmission est la seule technique permettant l'observation directe de la morphologie et de la taille des exosomes. Les exosomes peuvent être simplement observés après fixation sur des lames, colorés et contrastés aux métaux lourds, mais cette technique peut être combinée à l'utilisation d'anticorps couplés à des nanoparticules d'or permettant la détection de marqueurs spécifiques (immuno-ME) (Chuo *et al.*, 2018). D'autres techniques de ME telles que la ME à balayage, dont la préparation des échantillons requiert moins d'étapes que pour la ME à transmission, la cryo-ME, limitant l'altération de la structure des exosomes due à l'utilisation de produits chimiques déshydratants ou encore la microscopie à force atomique permettent de caractériser la structure tridimensionnelle des exosomes (Chuo *et al.*, 2018). Les exosomes peuvent être analysés de manière quantitative et qualitative par cytométrie en flux, cependant, cette technique nécessite l'adsorption des exosomes sur des particules portant des anticorps spécifiques fluorescents ou des anticorps dirigés contre des protéines spécifiques connues comme étant enrichies sur les exosomes afin que ceux-ci soient distingués du bruit de fond (Hartjes *et al.*, 2019). La distribution de la taille des vésicules par suivi individuel des particules (ou *nanoparticle tracking analysis*) permet également de déterminer la concentration et la taille des vésicules d'un échantillon fluorescent ou non, cependant, la présence d'autres éléments dans la suspension d'exosomes, tels que des agrégats protéiques, peut fausser les résultats (Hartjes *et al.*, 2019). Une technique similaire, l'analyse de la diffusion dynamique de la lumière (ou *dynamic light scattering*), permet le calcul de la taille moyenne des particules dans un échantillon, mais nécessite de travailler sur un échantillon très pur (Hartjes *et al.*, 2019). Différentes techniques telles que le western blot ou l'analyse par immunoaffinité permettant de caractériser biochimiquement les exosomes. L'analyse des marqueurs protéiques exosomaux par western blot est une technique simple et rapide à mettre en œuvre mais nécessitant un assez gros volume d'échantillon. Ces marqueurs peuvent également être

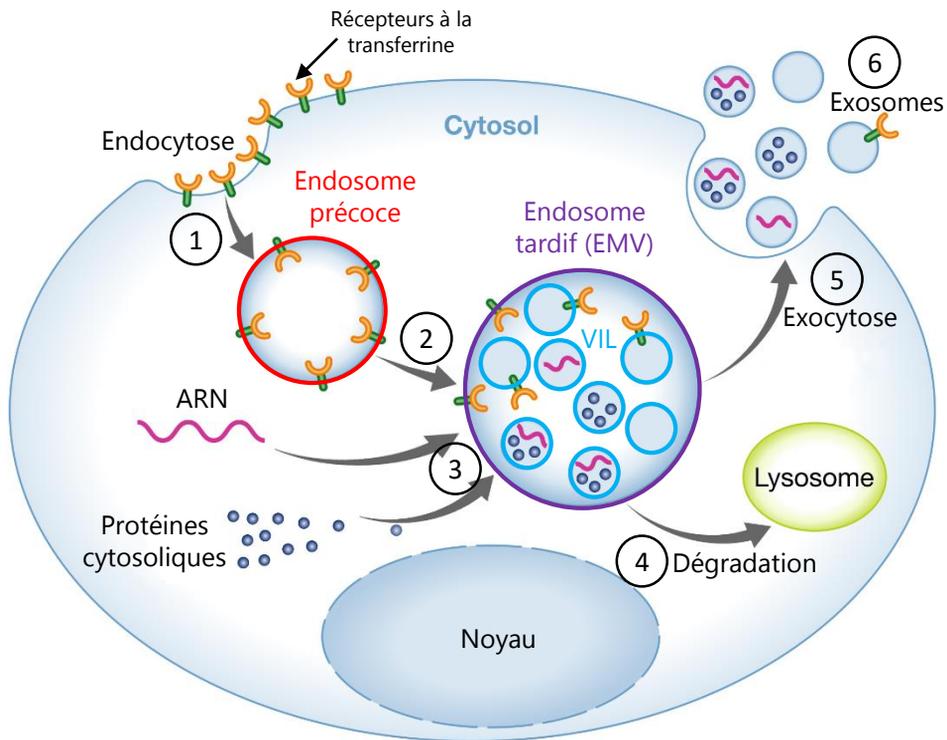


Figure 34 : Biogenèse des exosomes.

(1) Suite à l'endocytose, l'endosome précoce pouvant contenir des récepteurs extracellulaires tels que les récepteurs à la transferrine (2) est mûri en endosome tardif. (3) Des VIL formées par invagination de la membrane interne des endosomes précoces et capturant au passage des ARN et protéines cytosoliques s'accumulent dans la lumière des endosomes tardifs, alors appelés EMV. (4) Les EMV peuvent alors soit fusionner avec les lysosomes, entraînant la dégradation de leur contenu, (5) soit fusionner avec la membrane plasmique, provoquant le relargage des VIL dans le milieu extracellulaire, (6) vésicules alors nommées exosomes (modifiée d'après Schorey *et al.*, 2015).

analysés par ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), une technique facile à mettre en œuvre, spécifique, pouvant être miniaturisée sur puce (ExoChip), ou par une méthode alternative utilisant des anticorps secondaires porteurs d'un fluorochrome (FLISA, *fluorophore-linked immunosorbent assay*) (Hartjes *et al.*, 2019). Enfin, le profil protéique des exosomes peut être déterminé par spectrométrie de masse (Bandu *et al.*, 2019), leur profil lipidique peut être établi par chromatographie sur couche mince ou en gaz-liquide et par spectrométrie de masse (Skotland *et al.*, 2017), et leur composition en acides nucléiques peut être analysée par séquençage nouvelle génération ou RT-PCR quantitative (RT-PCRq) (Kim *et al.*, 2017b).

IV.3 Biogenèse et capture des exosomes

Les exosomes sont générés par la voie de l'endocytose qui conduit à la formation d'un endosome précoce, accumulant dans sa lumière des vésicules intra-luminales (VIL) au cours de sa maturation en endosome tardif, appelé alors EMV. Les VIL se forment par bourgeonnement inverse de la membrane des endosomes précoces et séquestration de protéines, de lipides et de composants cytosoliques (**Figure 34**). La biogenèse des VIL peut être dépendante de la machinerie ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*), ou bien indépendante de cette machinerie et reposer alors sur la présence de céramides dans la membrane de l'endosome ou sur les tétraspanines. Ces mécanismes pourraient agir en synergie et différentes sous populations de VIL pourraient être issues de différents mécanismes. Le choix du mécanisme contrôlant la biogenèse des VIL pourrait dépendre du type cellulaire ou de l'homéostasie cellulaire (Hessvik and Llorente, 2018).

Les VIL peuvent soit être dégradées lors de la fusion des EMV avec les lysosomes, soit être libérées dans le milieu extracellulaire suite à la fusion des EMV avec la membrane et sont alors nommées exosomes (Hessvik and Llorente, 2018) (**Figure 34**). L'orientation des EMV vers la dégradation lysosomale ou vers la fusion avec la membrane plasmique dépendrait de leur composition, cependant les mécanismes moléculaires régulant cette balance ne sont pas totalement connus. Dans des cellules dendritiques immatures, un enrichissement en cholestérol et en tétraspanine CD9 (Buschow *et al.*, 2009; Möbius *et al.*, 2003) conduirait à la sécrétion des EMV alors qu'un enrichissement en acide lysobisphosphatidique et un appauvrissement en cholestérol (Möbius *et al.*, 2003) ou encore l'ISGylation (une modification post-traductionnelle ubiquitine-like) de la protéine exosomale TSG101 (*tumor susceptibility gene 101*), conduiraient les EMV à la dégradation (Villarroya-Beltri *et al.*, 2016). La libération des exosomes fait intervenir différentes protéines telles que les protéines Rab facilitant l'attachement des EMV à la membrane plasmique et le complexe SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) facilitant la fusion entre les membranes endosomales et cellulaires (Hessvik and Llorente, 2018) (**Figure 35**).

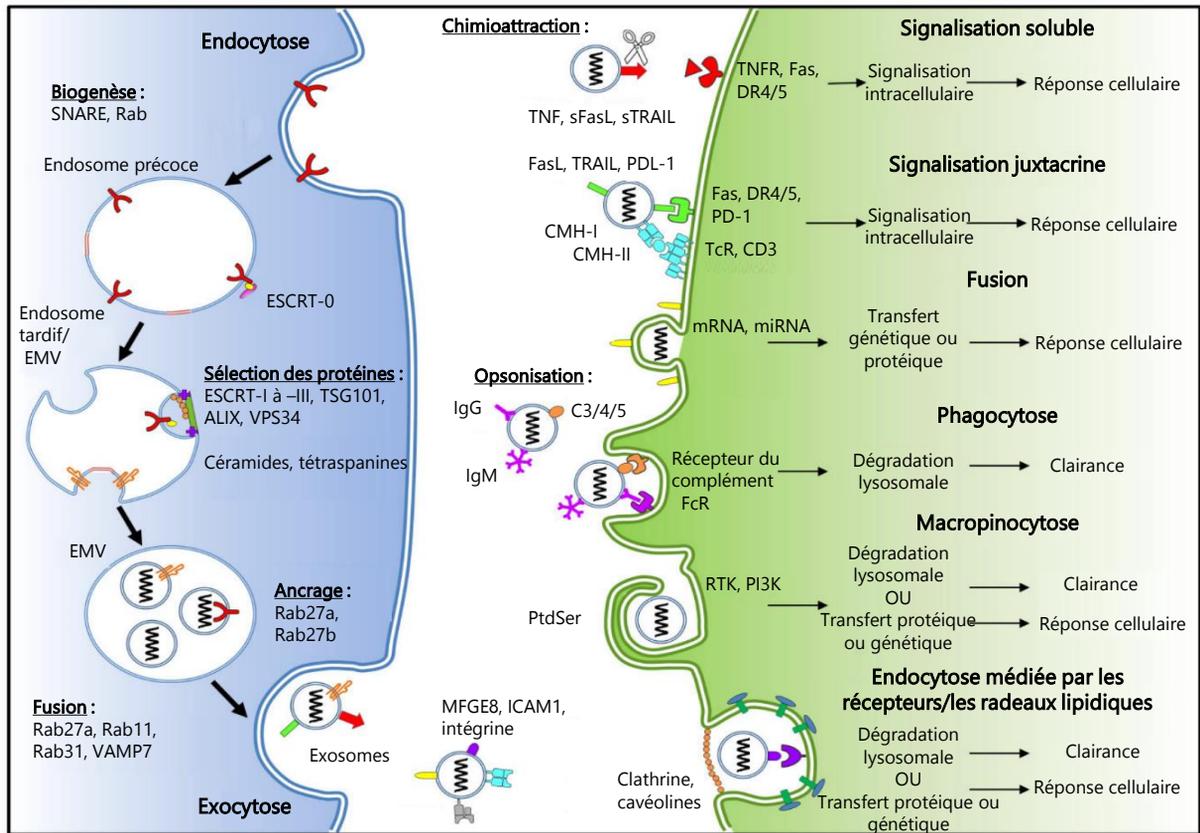


Figure 35 : Biogenèse des exosomes, internalisation et réponse de la cellule réceptrice.

Les exosomes sont générés suite à l'invagination de la membrane plasmique en un endosome précoce, un processus mettant en jeu les protéines Rab et SNARE. Au cours du bourgeonnement inverse de l'endosome précoce afin de former les vésicules intra-luminales, des éléments du cytosol et des protéines sont sélectivement incorporés dans ces vésicules grâce à la machinerie ESCRT. L'endosome multivésiculaire s'ancre alors à la membrane plasmique et fusionne avec celle-ci grâce aux protéines Rab et VAMP, permettant la libération des vésicules intra-luminales qui prennent alors le nom d'exosomes. Chacune de ces étapes fait intervenir de multiples protéines.

L'adhésion des exosomes aux cellules réceptrices est permise par l'interaction entre les protéines de surface des exosomes et différents récepteurs. Les ligands retrouvés sur les exosomes peuvent être clivés (tels que le TNF, FasL soluble, TRAIL soluble) et aller agir sur les récepteurs correspondants exprimés par la cellule cible (*signalisation soluble*). L'exosome peut également se lier aux récepteurs cellulaires *via* ses protéines de surface (telles que FasL, TRAIL, PDL-1, ICAM1, MFGE8, les intégrines ou les molécules du CMH), entraîner la transduction du signal *via* les voies de signalisation intracellulaires et être libéré (*signalisation juxtacrine*) ou fusionner avec la membrane de la cellule afin de transférer son contenu génétique et protéique dans le cytoplasme de la cellule réceptrice (*fusion*). En plus de porter leurs propres protéines de surface, les exosomes peuvent être opsonisés par d'autres protéines telles que les IgG, les IgM ou encore les protéines du complément. Ces protéines permettent aux exosomes d'être endocytés par *phagocytose* lors de la reconnaissance des opsonines par les récepteurs cellulaires (tels que le récepteur au complément ou le FcR). Les exosomes phagocytés sont ensuite dégradés par la cellule. La phosphatidylsérine retrouvée à la surface des exosomes dérivés des oligodendrocytes active la *macropinocytose* de certains macrophages. Ce processus conduit soit à la dégradation lysosomale de l'exosome, soit à un transfert de son matériel et à la mise en place d'une réponse de la cellule. Enfin, les ligands retrouvés à la surface des exosomes peuvent médier leur *endocytose via la clathrine ou la cavéoline cellulaire*. Les exosomes endocytés peuvent être envoyés à la dégradation lysosomale ou entraîner une réponse de la cellule *via* le transfert de leur contenu (modifiée d'après Mckelvey *et al.*, 2015).

Les exosomes libérés peuvent interagir avec des cellules cibles à proximité ou à distance et en moduler la physiologie *via* différents mécanismes : (i) la stimulation directe par des ligands de surface clivés ou non (signalisation soluble ou juxtacrine), (ii) la fusion des exosomes avec la membrane cellulaire et le transfert de leur contenu dans le cytoplasme de la cellule réceptrice (fusion), et (iii) l'endocytose des exosomes par phagocytose, macropinocytose ou endocytose médiée par les récepteurs (McKelvey *et al.*, 2015), ce dernier mécanisme pouvant dépendre de la clathrine ou de la cavéoline selon le type de cellule réceptrice (Horibe *et al.*, 2018) (**Figure 35**).

IV.4 Composition moléculaire des exosomes

Une large variété d'éléments constitutifs a été identifiée dans les exosomes sécrétés par différents types cellulaires. Les résultats de l'ensemble des études menées sont répertoriés dans la base de données ExoCarta (<http://www.exocarta.org>) (Keerthikumar *et al.*, 2016) recensant à l'heure actuelle 9769 protéines, 1116 lipides, 3408 ARNm et 2838 miARN identifiés chez 10 espèces différentes, illustrant ainsi la complexité et la diversité fonctionnelle potentielle des exosomes. La base de données Vesiclepedia (<http://microvesicles.org/>), qui comprend entre autres la base ExoCarta, répertorie également les données obtenues pour les autres types de vésicules membranaires (Kim *et al.*, 2013a; Pathan *et al.*, 2019).

IV.4.1 Protéines

Les exosomes portent un ensemble de protéines pouvant être retrouvées quel que soit le type cellulaire sécréteur ou bien spécifiques de celui-ci (**Figure 36**). Les protéines communément retrouvées peuvent être des protéines impliquées dans le trafic membranaire telles que les GTPases RAB et les annexines, la biogenèse des EMV telles que les protéines ALIX (*apoptosis-linked gene 2-interacting protein X*), les clathrines et TSG101, des molécules d'adhésion telles que MFGE8 (*milk fat globule-epidermal growth factor factor 8 protein*), les intégrines, les tétraspanines CD63, CD81, CD9, des molécules du CMH de classe I et II permettant la stimulation des cellules T, ou encore des protéines chaperonnes telles que HSC70 et HSP90 (*heat-shock protein 90*). Ces protéines sont spécifiquement enrichies dans les exosomes comparativement aux lysats cellulaires et sont alors considérées comme des marqueurs exosomaux positifs couramment utilisés pour confirmer l'identité des vésicules purifiées. Cependant, aucune donnée ne permet à ce jour de savoir si ces marqueurs sont spécifiques des exosomes et ne sont pas retrouvés dans les autres types de vésicules (Greening *et al.*, 2017).

Les protéines contenues dans les exosomes proviennent presque exclusivement de la membrane plasmique, du cytosol et des endosomes. Les protéines provenant des autres compartiments cellulaires telles que les protéines du noyau, des mitochondries, du RE ou encore de l'appareil de Golgi sont le plus souvent absentes des exosomes et peuvent alors servir de marqueurs

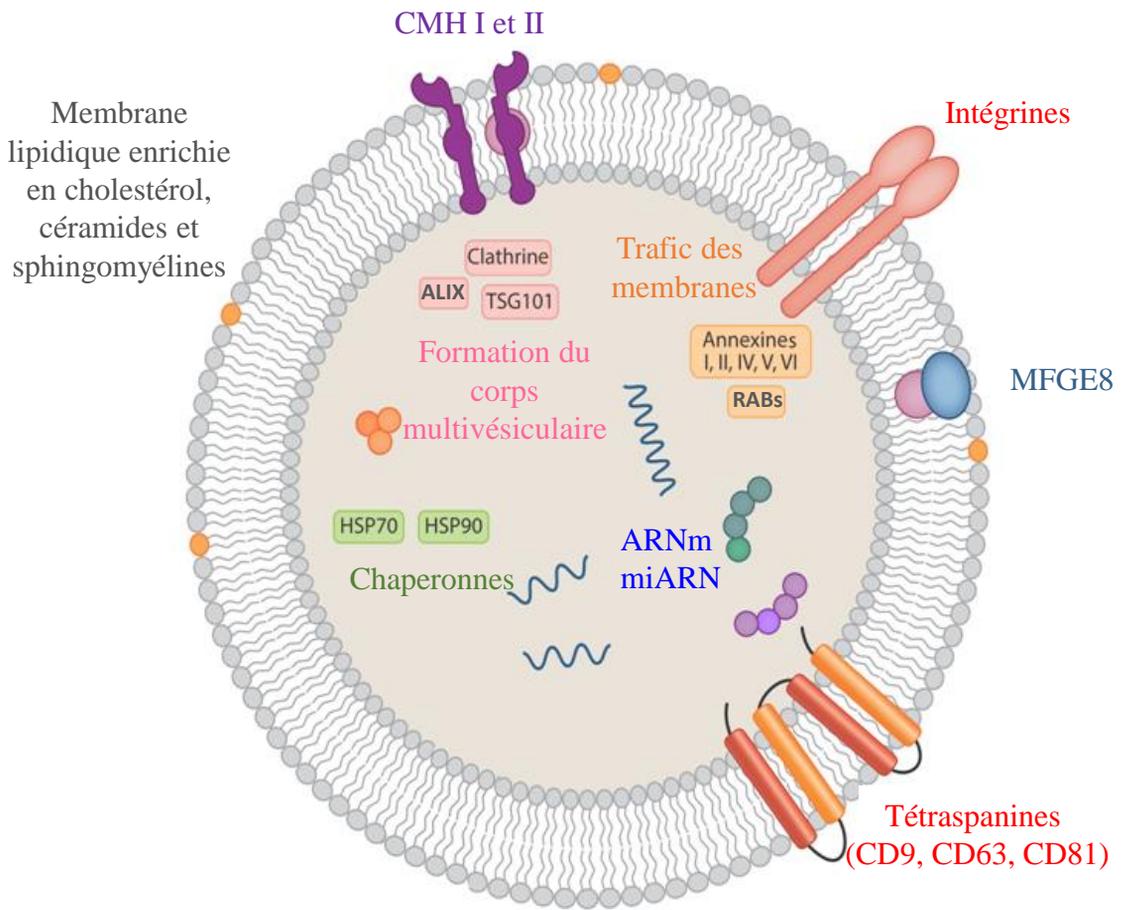


Figure 36 : Structure et composition d'un exosome.

Les exosomes sont des vésicules composées d'une membrane lipidique contenant différentes protéines comme les tétraspanines (CD9, CD63, CD81), MFGE8 et les intégrines impliquées dans l'adhésion mais aussi les molécules du CMH de classe I et II permettant la stimulation des cellules T. Ces exosomes renferment également des protéines impliquées dans la formation du corps multivésiculaire et le trafic des membranes, des chaperonnes, des lipides ainsi que des acides nucléiques tels que des ARNm et des miARN (modifiée d'après Kourembanas, 2015).

négatifs (Théry *et al.*, 2001). De plus, certaines protéines retrouvées abondamment à la surface de certains types cellulaires ne sont pas retrouvées dans les exosomes, telles que les récepteurs Fc pour les exosomes dérivés de cellules dendritiques, les protéines CD28 et CD40L pour les exosomes dérivés des cellules T et le récepteur à la transferrine pour les exosomes dérivés des cellules B, démontrant que ces exosomes ne proviennent pas directement de la membrane plasmique (Théry *et al.*, 2002a). A l'inverse, des protéines spécifiques de certains types cellulaires ont été détectées dans les exosomes telles que le récepteur des cellules T ou le récepteur des cellules B retrouvés dans les exosomes libérés par les lymphocytes T et B respectivement (Théry *et al.*, 2002a). Ensemble, ces données supportent le fait que ces vésicules proviennent de compartiments subcellulaires spécifiques et ne sont pas simplement le fruit d'une fragmentation cellulaire.

La sélection des protéines à incorporer dans les exosomes dépend de la machinerie ESCRT, des tétraspanines et des lipides. Ces protéines peuvent dériver de la biogenèse de ces vésicules ou être spécifiquement ciblées dans les exosomes grâce à des modifications post-traductionnelles (Moreno-Gonzalo *et al.*, 2018). L'ubiquitinylation est un des signaux les plus essentiels au ciblage des protéines aux exosomes. Les protéines ubiquitinylées sont reconnues et ciblées aux exosomes par la machinerie ESCRT lors de la biogenèse dépendante de ce mécanisme, ou probablement reconnues par les tétraspanines, les sphingolipides et les céramides lors de la biogenèse indépendante de cette machinerie (Moreno-Gonzalo *et al.*, 2018). La phosphorylation des protéines influencerait également le ciblage du cargo protéique aux exosomes, cependant aucun mécanisme de sélection spécifique des protéines phosphorylées n'a pu être identifié (Moreno-Gonzalo *et al.*, 2018). Un enrichissement en protéines glycosylées a été rapporté dans les exosomes comparativement à leur cellule parentale, suggérant un rôle de la glycosylation dans la régulation de la composition du cargo exosomal (Liang *et al.*, 2014). Par ailleurs, la SUMOylation et l'ISGylation pourraient permettre l'incorporation, respectivement, de l' α -synucléine (Kunadt *et al.*, 2015) et de TSG101 (Villarroya-Beltri *et al.*, 2016) dans les exosomes. Certains domaines protéiques sont impliqués dans le ciblage des protéines aux exosomes. En effet, la protéine Ndfip1, constitutivement sécrétée dans les exosomes possède un domaine L (ou *late domain*) contenant le motif PPxY reconnaissant les domaines WW des protéines à incorporer et induit l'ubiquitinylation de ces protéines afin de permettre leur incorporation dans les exosomes (Putz *et al.*, 2012; Sterzenbach *et al.*, 2017). De même, un enrichissement en protéines contenant un domaine *coiled-coil* a été rapporté dans les exosomes dérivées de la lignée de cellules de cancer colorectal LIM1215 comparativement aux protéines cytoplasmiques des cellules donneuses d'exosomes, mais de nouvelles études sont requises afin de déterminer si ce motif est vraiment nécessaire à la sélection du cargo exosomal (Mathivanan *et al.*, 2010). Enfin, les domaines lipidiques joueraient un rôle dans l'association spécifique de certaines protéines avec la membrane des exosomes. La sphingosine-1-

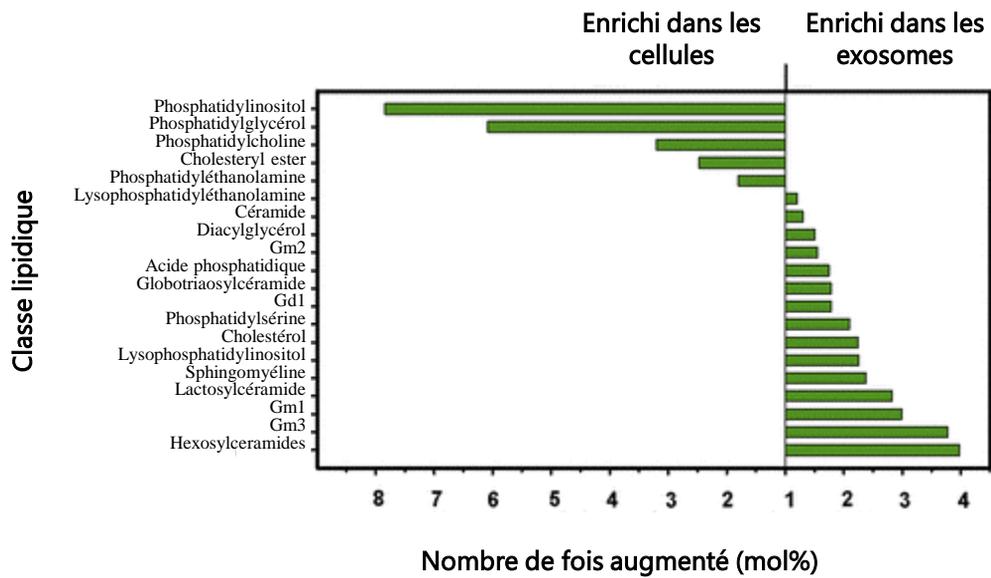


Figure 37 : Exemple d'enrichissement des lipides dans les cellules de cancer de la prostate (PC-3) et dans les exosomes sécrétés par les cellules PC-3.

La composition lipidique des exosomes diffère de celle de leur cellule parentale. GM1, GM2, GM3 et GD1 sont différents glycosphingolipides chargés négativement (modifiée d'après Llorente *et al.*, 2013).

phosphate (S1P), un lipide phosphorylé, régulerait l'incorporation de certaines protéines telles que CD63, CD81 et la flotilline dans les exosomes *via* des récepteurs à la S1P couplés aux protéines G inhibitrices situées à la membrane des EMV (Kajimoto *et al.*, 2013). A l'inverse, une étude publiée plus récemment suggère que la sélection des cargos lipidiques et protéiques ne semble pas être liée, la sélection des protéines dépendrait du type cellulaire producteur d'exosomes tandis que la sélection des lipides serait plutôt liée à la quantité d'exosomes sécrétée et à la taille des vésicules formées (Haraszti *et al.*, 2016).

IV.4.2 Lipides

Les exosomes transportent des lipides pouvant jouer un rôle important dans leur formation et le maintien de leur activité biologique (Subra *et al.*, 2007; Trajkovic *et al.*, 2008; Wubbolts *et al.*, 2003). La composition lipidique des exosomes ne reflète pas totalement celle de la cellule parentale (**Figure 37**). En effet, comparativement aux cellules dont ils sont issus, les exosomes sont enrichis en sphingomyéline, en cholestérol, en glycosphingolipides et en phosphatidylsérine, tandis que les niveaux de phosphatidyléthanolamine sont similaires entre les cellules donneuses et les exosomes. A l'inverse, une diminution du pourcentage de phosphatidylcholine et de phosphatidylinositol a été observée dans les exosomes comparativement à leurs cellules parentales (Skotland *et al.*, 2019). Les exosomes contiennent également des prostaglandines et des leucotriènes assurant leur stabilité et leur rigidité structurale. De plus, les prostaglandines contenues dans les exosomes sécrétés naturellement par les cellules basophiles de rat peuvent être transférées aux cellules basophiles réceptrices, induisant l'activation de PPAR γ (*peroxysome proliferator activated receptor γ*) et l'activation des cellules réceptrices de manière prostaglandines-dépendante (Subra *et al.*, 2010). A l'heure actuelle, les mécanismes régulant l'incorporation spécifique des lipides dans les exosomes ne sont pas totalement connus mais pourraient dépendre de la charge de la tête polaire ainsi que de la longueur et de la saturation de la chaîne d'acides gras (Haraszti *et al.*, 2016).

IV.4.3 Acides nucléiques

En 2007, Valadi et collaborateurs ont montré pour la première fois la présence d'acides nucléiques, ARN messagers et miARN, dans les exosomes sécrétés *in vitro* par des mastocytes (Valadi *et al.*, 2007). En effet, des exosomes dérivés de mastocytes humains HMC-1 et murins MC/9 transportent des ARNm vers les mastocytes voisins dans lesquels ils sont ensuite traduits en protéines, prouvant que ces ARNm sont fonctionnels (Valadi *et al.*, 2007). Depuis, d'autres types d'ARN ont été identifiés dans les exosomes, tels que les ARN ribosomiaux, les longs ARN non codants, les piwi ARN, les ARN de transfert, les ARN vault, les ARN Y, les petits ARN nucléaires et les petits ARN nucléolaires (Zhang *et al.*, 2019). Une augmentation de l'abondance relative en petits ARN et une forte prévalence des ARN non codants ont été observées de manière récurrente

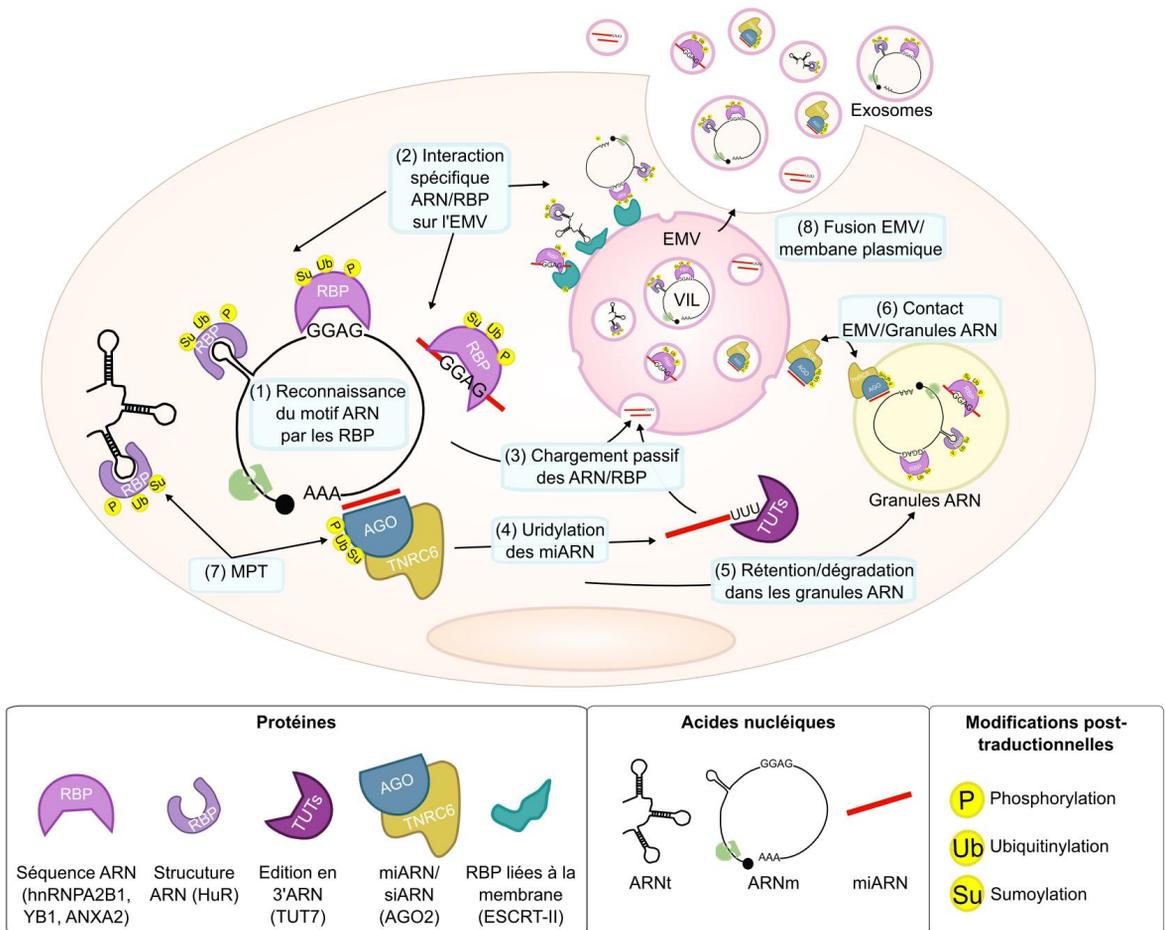


Figure 38 : Mécanismes suggérés pour l'incorporation des ARN dans les exosomes.

Les ARNs peuvent être capturés par les VIL de l'EMV de manière passive ou active. (1) Les protéines liant les ARN (RBP) peuvent se lier aux ARN intracellulaires portant certains motifs ou signaux (structure, séquence). (2) Une interaction spécifique entre les ARN, les RBP et les membranes de l'EMV *via* des récepteurs pourrait résulter en un enrichissement local en ARN à proximité des compartiments membranaires, modulant ainsi leur incorporation dans les VIL. (3) Alternativement, les RBP peuvent être incorporées passivement dans les VIL. (4) Des modifications des miARNs telles qu'une uridylation, connue pour réguler le renouvellement des ARN dans la cellule, pourraient également impacter l'incorporation des ARN dans les VIL par un mécanisme restant à identifier. (5) Lors d'une infection virale, d'un stress cellulaire ou d'un silencing induit par des miARN, les ARN peuvent être sélectivement envoyés dans les granules à ARN, pouvant moduler l'incorporation passive ou active des ARN dans les VIL, soit négativement en diminuant la quantité d'ARN solubles (6) soit activement en interagissant avec les EMV. (7) Ce processus peut être régulé par de multiples voies de signalisation induisant des modifications post-traductionnelles (MPT) spécifiques des RBP, affectant ainsi leur stabilité et la localisation subcellulaire des complexes ARN/RBP. (8) Les EMV contenant les VIL peuvent alors fusionner avec la membrane plasmique pour libérer les exosomes.

dans les exosomes comparativement aux cellules donneuses (van Balkom *et al.*, 2015; Collino *et al.*, 2010; Tosar *et al.*, 2015).

Le contenu des exosomes en ARN varie selon le type cellulaire sécréteur ou son statut. *In vitro*, un stress environnemental tel qu'une hypoxie ou un stress oxydatif altère le profil en ARN des exosomes tout comme il altère celui de la cellule donneuse (de Jong *et al.*, 2012). *In vivo*, une modification des profils en miARN exosomaux a été observée dans de nombreuses pathologies et notamment dans les cas de de cancers (Sun *et al.*, 2018), de pathologies inflammatoires (Console *et al.*, 2019) ou d'infections (Ojha *et al.*, 2019).

Certains miARN sont spécifiquement enrichis dans les exosomes comparativement aux cellules donneuses (Ragusa *et al.*, 2017). Des études ont été menées afin d'identifier les modalités d'incorporation des ARN (miARN et ARNm) dans les exosomes (**Figure 38**). L'annexine A2, une protéine capable de se lier aux ARN, régule l'empaquetage des ARN dans les exosomes de manière non sélective (Hagiwara *et al.*, 2015). L'adénylation à l'extrémité 3' des miARN a été associée à leur rétention intracellulaire tandis que leurs isoformes uridylées sont plus enrichies au sein des exosomes, suggérant que la partie 3' terminale des miARN contient un signal critique pour leur incorporation dans les exosomes (Koppers-Lalic *et al.*, 2014). Cependant, la présence d'uridylation en 3' est une signature de la dégradation des ARNm lors de l'apoptose et pourrait plutôt indiquer la présence de corps apoptotiques dans l'isolat d'exosomes (Thomas *et al.*, 2015). De nouvelles études sont nécessaires afin de déterminer le rôle de l'adénylation et de l'uridylation dans l'incorporation des miARN dans les exosomes. La séquence miARN spécifique « GGAG » appelée EXOmotif, est retrouvée à l'extrémité 3' de 75 % des miARN exosomaux et contrôlerait leur incorporation dans les exosomes en permettant la fixation de la ribonucléoprotéine hétérogène A2B1 (hnRNPA2B1) sumoylée, une modification essentielle à la reconnaissance des miARN par cette protéine (Villarroya-Beltri *et al.*, 2013). La protéine SYNCRIP (*synaptotagmin-binding cytoplasmic RNA-interacting protein*) permet de cibler spécifiquement les miARN portant le motif hEXO « GGCU » aux exosomes, un motif retrouvé dans environ 60% des miARNs enrichis dans les exosomes (Santangelo *et al.*, 2016). Les protéines liant habituellement les miARN sont les protéines Argonaute (AGO). Cependant, bien que certaines études détectent une quantité significative d'AGO dans les corps multivésiculaires (Gibbins *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009), d'autres rapportent leur déplétion voire leur absence des exosomes (Van Deun *et al.*, 2014; Shurtleff *et al.*, 2016). Des mutations conduisant à l'activation constitutive de la protéine KRAS (*V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), fréquente dans certains cancers, ont été montrées comme favorisant l'export d'AGO2 dans les exosomes ainsi que l'empaquetage de miARN dans les exosomes et la rétention intracellulaire d'autres miARN (McKenzie *et al.*, 2016). De plus, la protéine HuR (*human antigen R*) est capable de se lier au miR-122 après l'avoir dissocié d'AGO2

et de favoriser son incorporation dans les exosomes sécrétés par les cellules hépatiques soumises à un stress (Mukherjee *et al.*, 2016). Un mécanisme similaire impliquant les protéine YB-1 (*Y-box binding protein 1*) liant les ARN et associée aux exosomes a été mis en évidence (Frye *et al.*, 2009; Shurtleff *et al.*, 2016). YB-1 se lie à des miARN tels que le miR-223 et favorise leur capture par les exosomes. En présence d'YB-1, ce miARN ne s'associe pas à AGO2. De manière intéressante, la délétion de YB-1 conduit à une forte déplétion du miR-223 associé à YB-1 dans les exosomes et sa remobilisation dans les protéines AGO2 intracellulaires (Shurtleff *et al.*, 2016). De nouvelles études sont nécessaires afin de déterminer si la dissociation des miARN des protéines AGO et leur attachement à d'autres protéines liant les ARN telles que hnRNPA2B1, annexine A2, HuR et YB-1 est un phénomène général pouvant contribuer à l'incorporation sélective des ARN dans les exosomes. De plus, ces protéines pouvant s'associer à d'autres types d'ARN dont les ARNm, les ARNt et les petits ARN nucléolaires, il est important de déterminer si elles peuvent favoriser l'incorporation de ces types d'ARN dans les exosomes.

Les ARNm exosomaux semblent également sélectivement enrichis dans les exosomes. La présence d'une séquence d'environ 25 nucléotides a été mis en évidence dans la région 3'UTR du gène *GALR3* (*galanin receptor 3*). Cette séquence est ciblée par le miR-1289, qui, une fois fixé, permet le chargement de cet ARNm dans les exosomes (Bolukbasi *et al.*, 2012). Un enrichissement en 3 motifs structurels, « ACCAGCCU », « UAAUCCCA » et « CAGUGAGC », a également été mis en évidence dans les ARNm et les longs ARN non codants présents dans les exosomes. Ces trois motifs sont reconnus par les protéines YB-1 (pouvant reconnaître l'ensemble de ces motifs) et NSUN2 (*NOP2/Sun RNA methyltransferase 2*, ne reconnaissant que la séquence « CAGUGAGC ») qui incorporent alors les ARN dans les exosomes (Kossinova *et al.*, 2017). Le degré d'enrichissement des exosomes avec ces ARN dépend de la localisation des motifs spécifiques dans la séquence de l'ARN (Kossinova *et al.*, 2017). Enfin, de nombreuses autres protéines liant les ARN ont été identifiées au sein des exosomes et pourraient être impliquées dans l'incorporation des acides nucléiques (Statello *et al.*, 2018).

IV.5 Fonctions des exosomes

IV.5.1 Fonctions physiologiques des exosomes

Les exosomes ont longtemps été considérés comme un processus utilisé par les cellules pour éliminer les protéines et molécules indésirables (Johnstone, 1992; Pan *et al.*, 1985). La découverte de leur capacité à activer le système immunitaire et à induire une réponse anti-tumorale *in vivo* a amené l'idée que les exosomes seraient des médiateurs dans la communication intercellulaire (Raposo, 1996; Zitvogel *et al.*, 1998). Aujourd'hui, de nombreuses preuves ont pu montrer l'implication des exosomes au niveau physiologique.

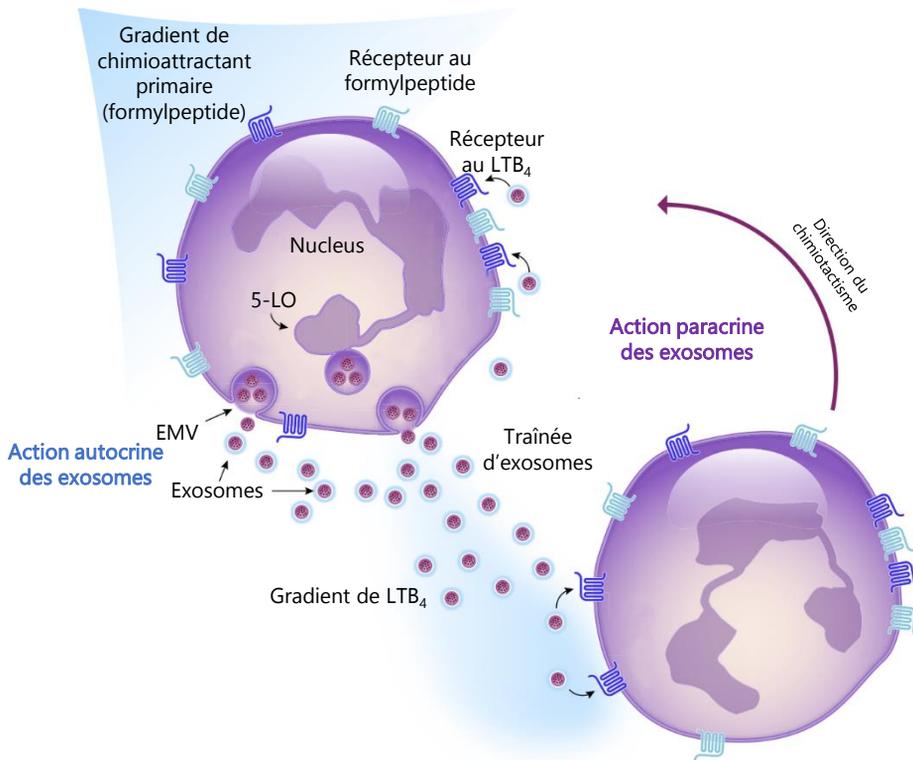


Figure 39 : Rôle des exosomes dans le recrutement des neutrophiles au cours d'une infection.

Les neutrophiles migrent en suivant un gradient de chimioattractant primaire constitué de formylpeptide. Au cours de leur migration, les neutrophiles libèrent des exosomes contenant la machinerie enzymatique nécessaire à la synthèse et à la libération de LTB₄, un chimioattractant. Les exosomes libérés opèrent de manière autocrine en sensibilisant les cellules au chimioattractant primaire et de manière paracrine en servant de guide aux neutrophiles migrant vers le site de l'infection (modifiée d'après Stahl et Raposo, 2019).

Une boucle de régulation positive mettant en jeu les exosomes a été observée au niveau du tissu adipeux. Les macrophages de type M1 et M2 retrouvés dans ce tissu sécrètent des exosomes influençant la sensibilité des adipocytes voisins à l'insuline. En effet, les macrophages de type M1 sécrètent des exosomes délivrant le miR-155 ciblant PPAR γ aux adipocytes, les rendant résistants à l'insuline tandis que les macrophages de type M2 sécrètent des exosomes ciblant également les adipocytes mais les rendant plus sensibles à l'insuline. *In vivo*, l'administration de ces deux types d'exosomes confirment les résultats obtenus *in vitro* (Ying *et al.*, 2017). De plus, les cellules souches du tissu adipeux sécrètent également des exosomes (Zhao *et al.*, 2018). Ces exosomes contiennent le facteur de transcription STAT2 et ciblent les macrophages du tissu adipeux afin d'augmenter la conversion ou l'accumulation des macrophages de type M2 (Zhao *et al.*, 2018). En réponse à la stimulation par ces exosomes, les macrophages M2 produisent des facteurs augmentant la prolifération des cellules souches du tissu adipeux, mettant ainsi en place une boucle de régulation positive limitant l'inflammation et le risque d'obésité et maintenant la population de précurseurs d'adipocytes (Zhao *et al.*, 2018).

Les exosomes jouent également un rôle dans l'homéostasie, la régénération tissulaire et la réparation des plaies. Par exemple, les exosomes dérivés des cellules souches hépatiques peuvent favoriser la régénération des hépatocytes (Herrera *et al.*, 2009). Suite à un traumatisme, les cellules épithéliales sécrètent un plus grand nombre d'exosomes contenant l'ARNm codant pour le *TGF β* (*transforming growth factor β*), stimulant la différenciation des fibroblastes afin d'initier la régénération tissulaire (Borges *et al.*, 2013). De même, les exosomes sécrétés par les cellules épithéliales intestinales contiennent l'annexine A1 participant à la réparation épithéliale et pourraient ainsi favoriser la cicatrisation de l'épithélium intestinal (Leoni *et al.*, 2015). A l'inverse, les ostéoclastes, en plus de réguler la résorption osseuse, sécrètent des exosomes transférant le miR-214-3p aux ostéoblastes afin d'inhiber la formation des os (Li *et al.*, 2016a).

IV.5.2 Exosomes et réponses immunitaires

IV.5.2.1 Réponses immunitaires innées

Lors d'une inflammation, les premiers neutrophiles arrivés sur place laisseraient sur leur passage des exosomes portant la machinerie enzymatique permettant la formation de leucotriène B4, agissant comme un signal chimiotactique pour les neutrophiles migrant vers le site de l'infection (Majumdar *et al.*, 2016) (**Figure 39**). Les cellules épithéliales intestinales sécrètent des exosomes impliqués dans la présentation antigénique en conditions inflammatoires, ce qui conférerait à ces cellules la capacité d'agir à distance sur les cellules de l'immunité (Van Niel *et al.*, 2001). Les mastocytes sécrètent également des exosomes induisant la maturation des cellules dendritiques,

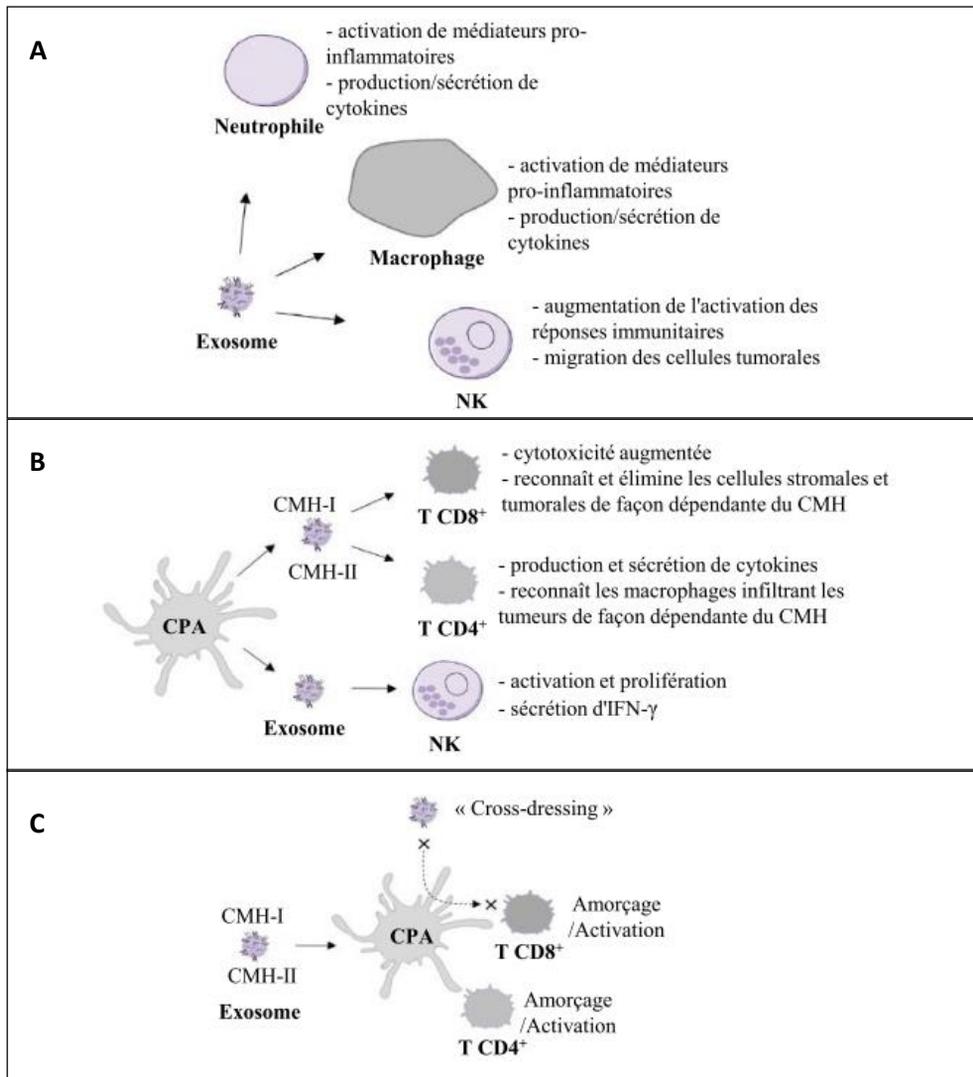


Figure 40 : Implication des exosomes dans la modulation des réponses immunitaires.

A. Les exosomes sécrétés par différents types cellulaires sont capables d'activer des réponses immunitaires telles que des réponses pro-inflammatoires avec une activation de médiateurs pro-inflammatoires ou encore l'augmentation de la production et de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires **B.** Exosomes et présentation antigénique directe. Des exosomes de CPA peuvent, grâce aux complexes peptides antigéniques-CMH qu'ils portent, activer directement les lymphocytes T. Egalement, des exosomes de CPA et plus particulièrement de cellules dendritiques portent à leur surface l'IL-15Ra, un ligand du récepteur NKG2D présent à la surface des cellules NK. L'activation du récepteur NKG2D entraîne l'activation et la prolifération des cellules NK, qui vont alors sécréter de l'IFN. **C.** Exosomes et présentation antigénique indirecte ou *cross-presentation*. Les exosomes peuvent porter des molécules du CMH de classe I et de classe II et peuvent également transporter des antigènes. Des CPA peuvent capturer ces exosomes, prendre en charge les peptides antigéniques, les associer avec leurs propres molécules du CMH et les présenter aux cellules T, qui vont s'activer en conséquence. Dans certains cas, les complexes pré-formés peptides antigéniques-CMH portés par les exosomes peuvent être directement pris en charge par les cellules dendritiques et présentés aux cellules T (processus nommé *cross-dressing*) (adaptée d'après Greening *et al.*, 2015).

permettant à ces dernières de devenir des CPA efficaces et de participer à la réponse inflammatoire (Skokos *et al.*, 2003).

L'activation des cellules immunitaires par un élément étranger tel qu'un pathogène entraîne la sécrétion d'exosomes dont le contenu est altéré et capables d'activer des réponses immunitaires de façon indépendante de toute présentation antigénique (**Figure 40A**). En effet, des macrophages stimulés avec du LPS ou infectés par des bactéries pathogènes telles que des mycobactéries sécrètent des exosomes pouvant stimuler la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires TNF- α , IL-6 et RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) par les macrophages, les cellules dendritiques ou les neutrophiles receveurs (Bhatnagar and Schorey, 2007; Giri and Schorey, 2008; Giri *et al.*, 2010). De plus, l'injection d'exosomes sécrétés *in vitro* par des macrophages infectés par *M. tuberculosis* ou *M. bovis* à des souris par voie intra-nasale augmente le relargage de TNF- α et IL-12 ainsi que le recrutement de neutrophiles et de macrophages dans les poumons (Bhatnagar *et al.*, 2007). De même, la stimulation *in vitro* de macrophages naïfs par des exosomes isolés de liquide broncho-alvéolaire de souris infectées par *M. bovis* entraîne une production accrue de TNF- α (Bhatnagar *et al.*, 2007). Aussi, des exosomes de cellules dendritiques activées au LPS convoient un message pro-inflammatoire aux cellules épithéliales intestinales qui sécrètent alors des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires telles qu'IL-8 et MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) et ce, de manière dépendante de la voie du TNF- α *in vitro* (Obregon *et al.*, 2009). Lors d'une infection par *Mycoplasma*, les cellules dendritiques sécrètent des exosomes qui entraînent la prolifération de lymphocytes B de manière non spécifique des antigènes et sans l'aide des lymphocytes T (Quah and O'Neill, 2007).

IV.5.2.2 Réponses immunitaires adaptatives

Les exosomes libérés par les cellules dendritiques et les lymphocytes B expriment à leur surface les CMH I et II chargés avec des antigènes capables d'activer *in vitro* des clones, des lignées et des hybrides de lymphocytes T naïfs ou ayant déjà rencontré l'antigène (Zeng and Morelli, 2018). De plus, des analyses en microscopie électronique ont rapporté la présence d'exosomes portant les molécules du CMH-II à la surface de cellules dendritiques folliculaires. Les cellules dendritiques folliculaires n'exprimant pas les molécules CMH-II, ces dernières auraient capturé les exosomes provenant des lymphocytes B situés à proximité (Denzer *et al.*, 2000). Du fait qu'ils puissent transporter des antigènes et qu'ils soient enrichis en molécules du CMH, les exosomes pourraient agir en tant que présentateurs antigéniques. Cette présentation peut être directe ou indirecte.

Présentation antigénique directe

Les exosomes peuvent directement, sans le recours à des cellules dendritiques, présenter les antigènes couplés aux molécules du CMH qu'ils portent (**Figure 40B**). Cependant, la capacité des exosomes dérivés des CPA à stimuler les cellules T est 10 à 20 fois inférieure à celle des CPA elles-mêmes (Raposo, 1996; Théry *et al.*, 2002b). Des exosomes de cellules dendritiques portant de l'ovalbumine (OVA) sur le CMH-I peuvent activer des hybridomes de cellules T CD8⁺ (Utsugi-Kobukai *et al.*, 2003). De même, des cellules dendritiques dérivées de monocytes chargées avec un mélange de 23 peptides immunogènes issus du virus Epstein barr, du virus Influenza et du cytomégalo virus sécrètent des exosomes portant des antigènes viraux capables d'activer des lymphocytes T *in vitro*, et ce, sans que la présence de cellules dendritiques soit nécessaire (Admyre *et al.*, 2006). Les cellules dendritiques infectées par *M. tuberculosis* sécrètent des exosomes capables d'activer les lymphocytes T grâce au complexe CMH-II-peptide porté par ces vésicules (Ramachandra *et al.*, 2010). De plus, les cellules T activées répondent plus efficacement aux exosomes dérivés des cellules dendritiques que les cellules T inactivées, et cette stimulation augmente l'expression des cytokines inhibitrices par les cellules T (Muller *et al.*, 2016). Les exosomes de cellules dendritiques induisent également l'activation et la prolifération des cellules NK (*natural killer*) *via* le récepteur IL-15R α présent à la surface des exosomes et reconnaissant l'IL-15 et *via* la protéine ULBP1 (*UL16 binding protein 1*), un ligand du récepteur NKG2D (*natural killer group 2 member D*) présent sur les cellules NK (Viaud *et al.*, 2009).

Présentation antigénique indirecte

Les exosomes peuvent réaliser de la présentation antigénique indirecte *via* les CPA qui prennent en charge les antigènes des exosomes, les assemblent avec les molécules du CMH qu'elles portent et les présentent aux lymphocytes qui s'activent en conséquence (**Figure 40C**). Lorsque des exosomes transportant des antigènes sont placés au contact de lymphocytes T et ceci en présence de cellules dendritiques réceptrices naïves, les lymphocytes T sont activés (Wolfers *et al.*, 2001). Les exosomes sécrétés par des macrophages infectés par *M. tuberculosis* ou *M. bovis* portent des antigènes bactériens et peuvent, en présence de CPA intermédiaires, activer des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ isolés de souris immuno-sensibilisées avec les mycobactéries (Giri and Schorey, 2008). Des cellules dendritiques de souris sécrètent des exosomes portant des antigènes et des molécules du CMH-II dont l'injection à des souris entraîne l'activation des lymphocytes T (Théry *et al.*, 2002b). Cependant, *in vitro*, l'incubation de ces exosomes au contact de lymphocytes T n'entraîne l'activation des cellules T qu'en présence de cellules dendritiques, qui constituent dans ce cas des intermédiaires indispensables à la présentation antigénique par les exosomes (Théry *et al.*, 2002b). De même, les cellules dendritiques isolées d'animaux ayant reçu des exosomes sécrétés

par des mastocytes murins contenant de l'OVA sont capables d'activer des hybridomes contenant des lymphocytes T spécifiques de l'OVA c'est-à-dire ne s'activant que suite à la présentation de cet antigène (Skokos *et al.*, 2003).

Des complexes préformés constitués de peptides antigéniques associés aux molécules du CMH présents dans les exosomes pourraient être directement pris en charge par les CPA réceptrices et présentés aux lymphocytes *via* un processus appelé *cross-dressing*. Alternativement, au lieu d'utiliser directement les complexes peptide-CMH apportés par les exosomes, les cellules dendritiques réceptrices pourraient recharger le peptide sur leur propre CMH endogène avant de le présenter aux lymphocytes (Campana *et al.*, 2015). Malgré tout, les exosomes constitueraient un outil efficace de distribution d'antigènes aux cellules dendritiques qui peuvent alors exercer leur fonction de CPA professionnelles et ce, *in vitro* et *in vivo*.

L'activation des cellules T entraîne une augmentation de la quantité d'exosomes sécrétés et la libération de populations exosomales distinctes en fonction de leur statut d'activation (van der Vlist *et al.*, 2012). Les exosomes dérivés des cellules T CD3⁺ sont capables de stimuler et d'induire la prolifération d'autres lymphocytes T CD3⁺. De plus, l'association de l'IL-2 et des exosomes dérivés de cellules T CD3⁺ induit une augmentation des cellules T CD8⁺ (Wahlgren *et al.*, 2012a). Les exosomes dérivés de cellules T CD8⁺ transportent le miR-150 et suppriment les réponses immunes spécifiques de manière dépendante des macrophages, qui induisent la prolifération des Treg et inhibent celle des cellules T effectrices (Nazimek *et al.*, 2015). Enfin, les cellules Treg sécrètent une quantité plus importante d'exosomes que les autres types de cellules T. Ces exosomes peuvent porter à leur surface les protéines CD39 et CD73 induisant la production d'adénosine, un nucléoside jouant un rôle important dans la réponse anti-inflammatoire et la suppression des cellules T (Clayton *et al.*, 2011), et contenir le miARN Let-7d supprimant la prolifération des Th1 et la sécrétion de cytokines, médiant ainsi l'immunosuppression (Okoye *et al.*, 2014).

IV.5.3 Exosomes et infections

Les exosomes jouent un rôle dans les infections virales, parasitaires, fongiques et bactériennes. Plusieurs virus utilisent les exosomes pour la sécrétion de protéines ou d'acides nucléiques non infectieux ou infectieux, et même de virions entiers, permettant de préparer les cellules réceptrices à l'infection ou de médier la transmission virale. En effet, les exosomes protègent les virions de l'élimination par les anticorps de l'hôte et élargit leur tropisme tissulaire puisque la spécificité cellulaire des exosomes est plus faible que celle médiée par les récepteurs viraux (Raab-Traub and Dittmer, 2017). Les exosomes seraient également des transporteurs efficaces pour la délivrance « en bloc » de plusieurs particules virales et génomes infectieux à une même cellule (Altan-Bonnet *et al.*, 2019). A l'inverse, les exosomes peuvent limiter la réplication

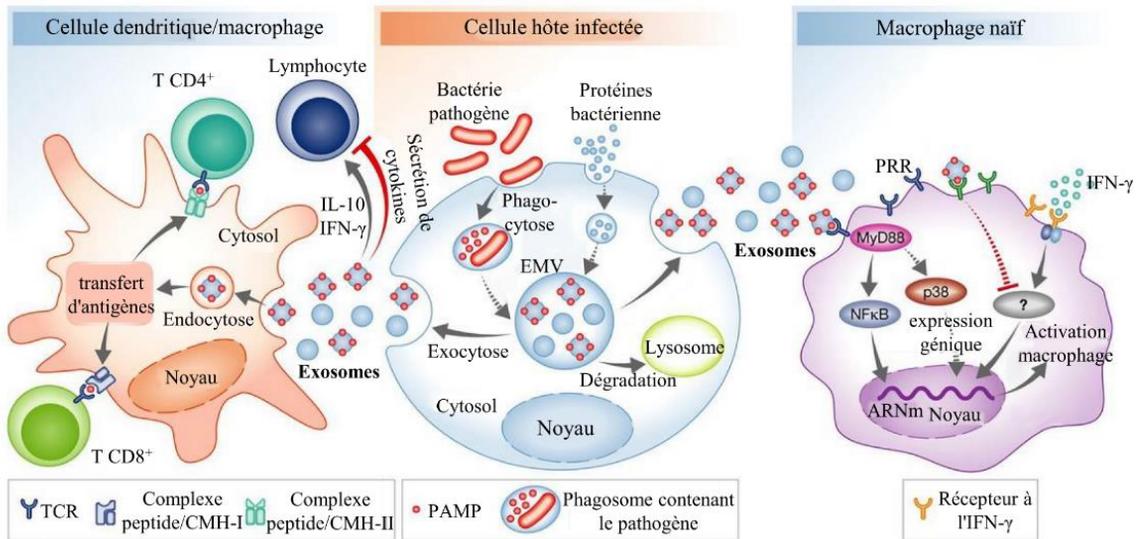


Figure 41 : Exosomes et infections bactériennes.

Lors d'une infection par une bactérie pathogène, les exosomes formés par la cellule hôte infectée peuvent contenir des antigènes bactériens, des PAMP. Ces exosomes peuvent être dégradés lors de la fusion de l'EMV avec un lysosome, ou être sécrétés dans le milieu extracellulaire. Ces exosomes peuvent alors être endocytés par des cellules dendritiques ou des macrophages naïfs qui vont prendre en charge les antigènes bactériens, les assembler avec leurs protéines du CMH de classe I et II et présenter aux cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ qui vont s'activer en conséquence. Les exosomes contenant des PAMP peuvent également induire la sécrétion d'IL-10 et d'IFN-γ, ou au contraire inhiber la production de cytokines par les lymphocytes B. Egalement, les PAMP transportés par les exosomes de cellules infectées peuvent, par liaison aux récepteurs PRR, activer des voies de signalisation permettant l'activation des macrophages cibles (modifiée d'après Schorey *et al.*, 2015).

virale au sein des cellules réceptrices en entraînant la dégradation du matériel viral, en empêchant la synthèse de protéines fonctionnelles ou encore en transférant des molécules conférant une résistance à l'infection virale aux cellules réceptrices (Dias *et al.*, 2018). Bien souvent, ces effets contradictoires coexistent au cours de l'infection virale.

Concernant les infections parasitaires, les exosomes peuvent être sécrétés par des cellules infectées ou relargués par les parasites eux-mêmes. Ces exosomes favorisent généralement la dissémination du parasite mais peuvent également favoriser la défense de l'hôte contre l'infection (Wu *et al.*, 2019).

Concernant l'implication des exosomes dans les infections fongiques, peu de données sont disponibles à ce jour dans la littérature. Les quelques études publiées se sont limitées à analyser l'implication des exosomes sécrétés par les champignons et non par les cellules infectées (Joffe *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018c).

Enfin, les exosomes peuvent jouer un rôle dans les infections bactériennes en transférant des composants bactériens ou des molécules de l'hôte modulant les réponses immunitaire de l'hôte (Schorey *et al.*, 2015). Dans le cadre de cette thèse, seule l'implication des exosomes dans les infections bactériennes sera développée.

Exosomes et infections bactériennes

Les exosomes sécrétés par les cellules infectées par des bactéries intracellulaires peuvent réguler l'expression de certains facteurs et moduler les réponses immunitaires antibactériennes dans les cellules réceptrices (**Figure 41**). L'infection par *M. tuberculosis*, *M. avium* ou encore *M. smegmatis* favorise la libération d'exosomes par les macrophages infectés (Anand *et al.*, 2010; Ramachandra *et al.*, 2010). Certaines protéines mycobactériennes contiendraient un signal permettant leur ciblage aux ILV, favorisant leur incorporation dans les exosomes (Giri *et al.*, 2010). L'analyse de la composition protéique des exosomes de macrophages infectés par *M. tuberculosis* montre une augmentation de l'abondance de 41 protéines donc 63% prédites comme étant associées à la membrane exosomale (Diaz *et al.*, 2016). Les exosomes des macrophages infectés par *M. tuberculosis* contiennent la lipoprotéine de 19 kDa LpqH (Giri *et al.*, 2010) qui favorise l'inflammation et stimule l'activation des macrophages et l'expression du TNF- α via la voie TLR/MyD88 (Stewart *et al.*, 2005). Concernant *M. avium* et *M. smegmatis*, une augmentation du niveau de HSP70 (*heat shock protein 70*) a été rapportée dans les exosomes et favorise l'activation des macrophages et l'expression du TNF- α *in vitro* (Anand *et al.*, 2010). De plus les exosomes de macrophages infectés par *M. avium* contiennent des glycopeptidolipides pouvant être transférés aux macrophages receveurs non infectés et induire une réponse pro-inflammatoire (Bhatnagar and Schorey, 2007).

Outre des protéines, les exosomes sécrétés par les macrophages infectés par les mycobactéries contiennent des ARNs bactériens ainsi que des ARNm humains fonctionnels (Singh *et al.*, 2015) et des miARN de l'hôte, ces derniers ciblant potentiellement différentes voies métaboliques de l'hôte suite à l'infection (Alipoor *et al.*, 2017, 2019). De manière similaire, l'infection de macrophages THP-1 par *Yersinia pestis* et *Bacillus anthracis* entraîne une modification du contenu des exosomes en miARN de l'hôte variable selon le pathogène (Fleming *et al.*, 2014), suggérant que l'envoi des ARN cellulaires ou bactériens aux exosomes serait un phénomène impliqué dans l'infection. Suite à une exposition au LPS, les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse sécrètent des exosomes contenant les miR-146a et miR-155. Ces miARN peuvent être transférés aux cellules réceptrices dans lesquelles ils modulent l'expression des gènes de l'inflammation et reprogramment la réponse des cellules aux endotoxines (Alexander *et al.*, 2015). De même, les exosomes dérivés du sérum de souris présentant une septicémie induite par injection intrapéritonéale de LPS sont sélectivement enrichis en miR-155 activant les réponses pro-inflammatoires (Jiang *et al.*, 2019). *In vitro*, ces exosomes stimulent l'activation de NF- κ B et induisent la production de TNF- α et d'IL-6, mais favorisent également la prolifération des macrophages. *In vivo*, l'injection intraveineuse de ces exosomes à des souris naïves augmente le recrutement de macrophages M1 au niveau pulmonaire et induit une inflammation pulmonaire (Jiang *et al.*, 2019). Les exosomes de macrophages infectés par *Helicobacter pylori* présentent également une augmentation du niveau du miR-155, et ce miARN est capable d'augmenter les réponses inflammatoires dans les macrophages receveurs des exosomes, limitant ainsi la réplication de *H. pylori* et prévenant la gastrite induite par l'infection par *H. pylori* (Wang *et al.*, 2016c). Les cellules de l'épithélium gastrique infectées par *H. pylori* positifs pour le facteur de virulence majeur bactérien appelé CagA (*cytotoxin-associated gene A*) et codé par le gène *cagA* sécrètent des exosomes transportant le facteur CagA fonctionnel. Ces exosomes peuvent entrer dans la circulation générale et délivrer le facteur CagA aux organes et tissus à proximité ou à distance du site de l'infection (Shimoda *et al.*, 2016). Au niveau gastrique, les exosomes du sérum des patients infectés par *H. pylori* et atteints de gastrite chronique peuvent induire l'expression du récepteur à l'IL-6 soluble augmentant lui-même l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 α dans les cellules épithéliales gastriques (Chen *et al.*, 2018b). Au niveau systémique, ces exosomes pourraient potentiellement contribuer à augmenter le risque de cancer colorectal (Strofilas *et al.*, 2012) et à diminuer le risque de cancer pancréatique (Risch *et al.*, 2014) chez les individus infectés par des souches de *H. pylori* positives pour CagA.

Les exosomes isolés de cellules épithéliales intestinales ou de macrophages infectés par les *E. coli* AIEC peuvent quant à eux activer les macrophages naïfs *via* l'activation des voies NF- κ B et MAPK, conduisant à une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et

TNF- α (Carrière *et al.*, 2016b). Ces exosomes peuvent également activer les cellules épithéliales intestinales naïves *via* la voie NF- κ B et induire la sécrétion d'IL-8. De plus, ces exosomes favorisent la réplication intracellulaire des AIEC dans les cellules épithéliales intestinales et les macrophages receveurs (Carrière *et al.*, 2016b). L'infection de souris transgéniques CEABAC10 par la souche AIEC LF82 dans un modèle d'anse iléale induit la sécrétion d'exosomes dans la lumière intestinale. Les exosomes isolés du lumen sont capables d'induire une réponse pro-inflammatoire dans les macrophages murins naïfs stimulés *in vitro* (Carrière *et al.*, 2016b). Cependant, les composants exosomaux responsables de ces effets restent à identifier.

Les exosomes dérivés de cellules infectées peuvent à l'inverse inhiber les réponses immunitaires antibactériennes. En effet, les exosomes de macrophages infectés par *M. tuberculosis* ou *M. avium* inhibent partiellement la capacité des macrophages receveurs à répondre à l'IFN- γ , les empêchant de jouer leur rôle de CPA (Singh *et al.*, 2011). De plus, les exosomes sécrétés par les macrophages infectés par *M. tuberculosis* contiennent notamment du lipoarabinomannane, un glycolipide inhibant l'activation des lymphocytes T (Mahon *et al.*, 2012). Lors d'une infection par des bactéries du genre Mycoplasme, les cellules tumorales sécrètent des exosomes activant les cellules B (Quah and O'Neill, 2007) qui en retour libèrent des exosomes inhibant l'activation des cellules T (Yang *et al.*, 2012). Enfin, dans le cas d'une infection par *B. anthracis*, les exosomes sécrétés par les cellules épithéliales infectées contiennent la toxine létale de l'anthrax, un facteur de virulence bactérien clivant la plupart des MAPK et le récepteur NLRP1 de l'inflammasome et conduisant à l'inhibition de ces voies. Ces exosomes délivrent cette toxine à des cellules situées à distance du site infectieux, contribuant ainsi la diffusion et à la persistance de ces toxines au sein de l'hôte (Abrami *et al.*, 2013).

IV.5.4 Exosomes et MICI

Plusieurs études ont évalué l'effet des exosomes dans de nombreuses pathologies inflammatoires telles que les cancers, le diabète, certaines maladies auto-immunes et les maladies neuro-inflammatoires, ou encore les MICI et suggèrent que les exosomes pourraient potentiellement participer à la progression de ces pathologies (Chan *et al.*, 2019).

Comparativement aux exosomes de sujets sains, les exosomes isolés du lumen intestinal des patients atteints de MICI renferment des quantités plus importantes d'ARNm et de protéines IL-6, IL-8, IL-10 et TNF- α pro-inflammatoires, dont le niveau dans les exosomes est corrélé au score de sévérité de la MC (Mitsubishi *et al.*, 2016). De plus, les exosomes du contenu luminal de ces patients activent les cellules épithéliales intestinales *in vitro* qui produisent alors une plus grande quantité d'IL-8 (Mitsubishi *et al.*, 2016). Les exosomes des patients atteints de MICI ainsi que les cellules épithéliales traitées avec ces exosomes induisent la migration d'un plus grand nombre de

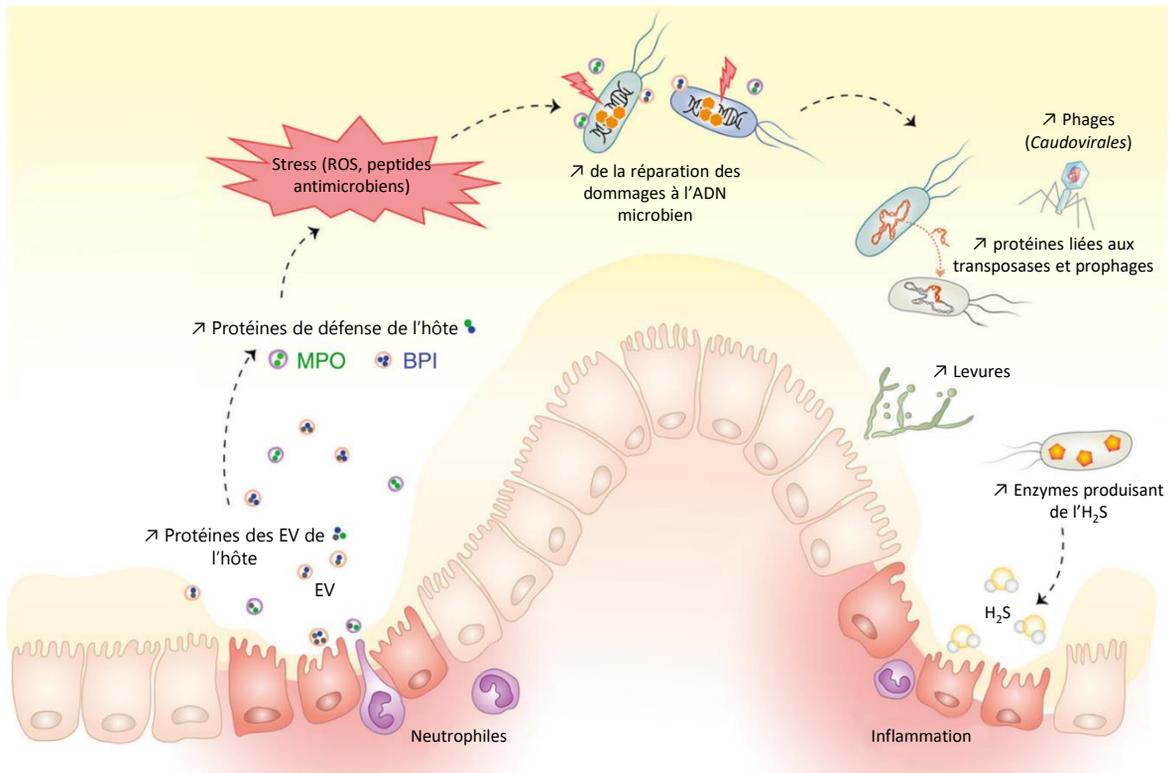


Figure 42 : Vésicules extracellulaires et MICI.

Chez les patients atteints de MICI, comparativement aux sujets contrôles, les vésicules extracellulaires (EV, comprenant les exosomes, les microvésicules et les OMV bactériens) situées à l'interface entre le lumen et la muqueuse présentent une augmentation en certaines protéines et notamment en protéines de défense de l'hôte telles que la myéloperoxydase (MPO) et les protéines bactéricides augmentant la perméabilité (BPI, *bactericidal/permeability-increasing protein*). Ces protéines de l'hôte pourraient entraîner un stress sur le microbiote intestinal, induisant une dysbiose et une modification de l'expression des gènes et des fonctions de ce microbiote. Une augmentation de la quantité de levures a été observée dans le microbiote des patients atteints de MICI comparativement aux sujets contrôles. Au niveau protéomique, une augmentation de l'expression des protéines liées aux transposases bactériennes (catalysant le déplacement des transposons pouvant être également transférés à d'autres bactéries) et aux prophages a été observée dans le microbiote des patients atteints de MICI comparativement aux sujets contrôles. Ces protéines sont des facteurs clés de la dynamique et de la capacité d'adaptation du microbiote en réponse à un changement de l'environnement. Une augmentation des protéines des phages *Caudovirales*, ainsi qu'une augmentation des enzymes impliquées dans la production d'H₂S et de la quantité de cette molécule a également été observée chez les patients atteints de MICI comparativement aux sujets contrôles. L'ensemble de ces modifications pourraient avoir un effet sur l'inflammation intestinale. Ainsi, l'altération de la composition des EV serait associée aux altérations de l'interaction entre l'hôte et son microbiote observée dans le cas de MICI (modifiée d'après Zhang *et al.*, 2018d).

macrophages que les cellules épithéliales non traitées *in vitro* (Mitsuhashi *et al.*, 2016). De même, les exosomes isolés du sérum de souris présentant une colite induite au DSS contiennent 56 protéines différentiellement exprimées comparativement aux exosomes de souris contrôles et peuvent activer les macrophages naïfs *via* la voie MAPK et induire la production de TNF- α (Wong *et al.*, 2016). Une augmentation des protéines humaines associées à la défense antimicrobienne de l'hôte et notamment au stress oxydant a été observée dans les vésicules extracellulaires (comprenant des exosomes, des microvésicules et des OMV bactériennes) retrouvées à l'interface entre la muqueuse et le lumen intestinal chez les patients atteints de MICI comparativement aux sujets contrôles (Zhang *et al.*, 2018d). De plus, une augmentation des protéines microbiennes associées aux réponses à un stress oxydant a été rapportée au niveau du microbiote intestinal chez ces patients comparativement aux sujets contrôles et corrélée à une altération des fonctions de ce microbiote. Ainsi, l'altération de la composition protéique des vésicules extracellulaires serait associée aux altérations des fonctions du microbiote et participerait aux interactions anormales observées entre l'hôte et son microbiote chez les patients atteints de MC (Zhang *et al.*, 2018d) (**Figure 42**).

IV.6 Exosomes : un outil diagnostique, pronostique et thérapeutique

IV.6.1 Exosomes : outils diagnostiques et pronostiques prometteurs

Les exosomes retrouvés dans les fluides biologiques présentant une composition différente entre sujets sains et patients atteints de diverses pathologies telles que les cancers, les maladies inflammatoires et les infections, ils constituent un outil intéressant pour la découverte de biomarqueurs par des méthodes peu ou non invasives (Barile and Vassalli, 2017).

De nombreuses analyses de la composition en protéines et en acides nucléiques des exosomes isolés de divers fluides biologiques chez des patients atteints de cancers ont permis l'identification de marqueurs exosomaux pouvant potentiellement aider au diagnostic et à l'établissement du pronostic de ces pathologies (Wong and Chen, 2019).

L'utilisation d'exosomes comme biomarqueurs de pathologies inflammatoires non cancéreuses telles que la polyarthrite rhumatoïde, l'insuffisance rénale aiguë ou encore les MICI a également été étudiée (Console *et al.*, 2019). Concernant les MICI, une augmentation du niveau des exosomes contenant l'annexine A1 a été observée dans le sérum des patients comparativement aux sujets sains et pourrait être un biomarqueur potentiel de l'inflammation de la muqueuse intestinale (Leoni *et al.*, 2015). Plus de 2000 protéines ont été détectées dans les exosomes isolés de la salive de patients atteints de MICI, une quantité bien plus importante que celle retrouvée chez les sujets sains (Zheng *et al.*, 2017). Parmi ces protéines, le biomarqueur le plus prometteur est représenté par le PSMA7 (*proteasome subunit alpha type 7*) dont l'expression est fortement augmentée chez les patients atteints de MICI comparativement aux sujets sains (Zheng *et al.*, 2017). Les exosomes de

la lumière intestinale pourraient également contribuer au diagnostic des MICI grâce à leur contenu en ARNm *IL-6*, *IL-8*, *IL-10* et *TNF- α* et en protéines correspondantes (Mitsuhashi *et al.*, 2016).

L'utilisation d'exosomes en tant que biomarqueurs a été envisagée dans le cadre de pathologies infectieuses et plus particulièrement dans l'infection par des mycobactéries. Vingt protéines mycobactériennes connues pour contribuer à la survie intracellulaire de *M. tuberculosis*, ont été mises en évidence dans les exosomes dérivés du sérum des patients infectés par cette bactérie (Kruh-Garcia *et al.*, 2014). De plus, les profils en ARNm (Lv *et al.*, 2017) et en miARN (Alipoor *et al.*, 2017; Lyu *et al.*, 2019) des exosomes du sérum varient entre les sujets sains, les patients atteints de tuberculose active et ceux atteints de tuberculose latente et pourraient donc servir de biomarqueurs. De même, la variation du pourcentage en petits ARN dérivés de séquences répétées du génome dans les exosomes du sérum des patients pourrait être un biomarqueur de la progression de la tuberculose (Lyu *et al.*, 2019). Enfin, une expression différentielle des miR-148a-3p, miR-451a et miR-150-5p exosomaux a été rapportée au niveau des effusions pleurales de lésions bénignes de la tuberculose, faisant de ces miARN des biomarqueurs prometteurs de cette pathologie (Wang *et al.*, 2017b).

Dans le cadre des infections virales, un panel de 4 miARN (miR-450a-5p/miR-103a-3p et miR-103b-5p/miR-98-5p) retrouvés dans les exosomes du sérum de patients a été considéré comme un biomarqueur potentiel d'une pneumonie à adénovirus dans une population pédiatrique (Huang *et al.*, 2019). Une analyse des exosomes de patients atteints de carcinome hépatocellulaire dû à une infection par le virus de l'hépatite C a montré un intérêt potentiel du lncRNA-HEIH dans le diagnostic de cette pathologie (Zhang *et al.*, 2018a).

Concernant les infections parasitaires, une seule étude a pu mettre en évidence l'augmentation du niveau de 4 miARN spécifiques du parasite *Schistosoma* dans les exosomes circulants de patients infectés (Meningher *et al.*, 2016).

IV.6.2 Exosomes : outils thérapeutiques prometteurs

IV.6.2.1 Exosomes et modulation des réponses immunes en modèle animal

IV.6.2.1.1 Vaccination par les vésicules extracellulaires eucaryotes et procaryotes

Les exosomes peuvent moduler les réponses immunitaires et jouer le rôle de présentateurs antigéniques (voir IV-5-2 Exosomes et réponses immunitaires), de ce fait leur utilisation en tant que « vaccin » dans les pathologies infectieuses a été proposée. Une première étude menée en ce sens a montré que les exosomes de cellules infectées par les bactéries pathogènes *M. bovis* ou *M. tuberculosis* peuvent activer des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques d'antigènes *in vivo* et promouvoir l'activation et la maturation de cellules dendritiques (Giri and Schorey, 2008). Des

macrophages traités avec des protéines de *M. tuberculosis* relarguent des exosomes recrutant les cellules dendritiques CD11b⁺ au niveau pulmonaire (Singh *et al.*, 2012) et activant les cellules dendritiques et les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ après injection par voie intra-nasale à des souris (Giri *et al.*, 2010). *In vivo*, l'infection par *M. tuberculosis* entraîne la libération d'exosomes augmentant l'activation des cellules T et des réponses immunitaires acquises, laissant supposer qu'une présentation antigénique croisée favoriserait la mise en place d'une immunité acquise lors de l'infection par cette bactérie (Smith *et al.*, 2017).

Les cellules dendritiques traitées avec la toxine diphtérique relarguent des exosomes qui, une fois injectés par voie intraveineuse à des souris, stimulent une réponse IgG spécifique de la toxine (Colino and Snapper, 2006). De manière similaire, les exosomes libérés par les cellules dendritiques contiennent un antigène présentant une réactivité croisée avec l'antigène Cps14 (*capsular polysaccharide 14*) de *S. pneumoniae* et stimulent la mise en place de réponses IgM et IgG dirigées contre cet antigène, protégeant les souris d'une infection par *S. pneumoniae* de type 14 (Colino and Snapper, 2007). De même, la stimulation de cellules dendritiques avec des antigènes de *Toxoplasma gondii* entraîne la libération d'exosomes, qui, une fois injectés par voie intrapéritonéale à des souris, induisent la production d'anticorps IgM et IgG anti-*T. gondii* détectés dans le sérum et protègent de l'infection par *T. gondii* (Aline *et al.*, 2004). De même, les exosomes de cellules dendritiques pulsées avec les antigènes dérivés de *T. gondii* injectés par voie intraveineuse sont capables de protéger les souris syngéniques et allogéniques de l'infection orale par ce parasite (Beauvillain *et al.*, 2007). La vaccination de souris femelles avant gestation avec ces mêmes exosomes par injection sous cutanée permet de protéger leur descendance de la toxoplasmose congénitale induite par l'infection des mères par *T. gondii* (Beauvillain *et al.*, 2009). Les exosomes dérivés de cellules dendritiques infectées par *Leishmania* contiennent des antigènes de ce parasite et leur utilisation en tant que vaccin par injection intraveineuse en modèle murin confère une immunité protectrice contre la leishmaniose cutanée (Schnitzer *et al.*, 2010). Les exosomes isolés du sang de souris infectées par *Plasmodium yoelii* contiennent également des protéines parasitaires et leur injection sous cutanée en tant que vaccin à des souris naïves stimule la production d'IgG reconnaissant les globules rouges infectés par *P. yoelii*, protégeant ainsi les souris d'une future infection par *P. yoelii* (Martin-Jaular *et al.*, 2011). Enfin, les exosomes sécrétés par le nématode gastro-intestinal *Trichuris muris*, similaire au nématode gastro-intestinal *Trichuris trichiura* responsable d'une forte morbidité chez l'Homme, peuvent induire la mise en place d'une immunité protectrice lors de leur injection sous forme d'exosomes intacts en tant que vaccin en modèle murin (Shears *et al.*, 2018).

Les exosomes pourraient par ailleurs constituer une ligne de défense vis-à-vis des infections virales, mais une seule étude à pour le moment été menée *in vivo*. L'injection d'exosomes contenant

la protéine S du coronavirus responsable du syndrome respiratoire aigu sévère à des souris induit une augmentation du titre d'anticorps neutralisants de la même manière que le vaccin vecteur adénoviral exprimant la protéine S. De plus, la combinaison d'un premier traitement aux exosomes puis de l'administration du vecteur viral pour booster les réponses immunitaires permet d'obtenir chez la souris un titre d'anticorps neutralisants supérieur à celui observé dans le sérum d'un patient en convalescence (Kuate *et al.*, 2007).

Enfin, plusieurs études ont mis en évidence la capacité des OMV de différentes souches bactériennes à induire une protection contre une future infection par ces bactéries. Les OMV sécrétées par *Shigella flexneri* contiennent plusieurs antigènes de *Shigella* tels que les protéines IpaB et IpaC. L'administration intranasale de ces vésicules protège les souris de l'infection par une souche virulente de *S. flexneri* (Camacho *et al.*, 2013; Pastor *et al.*, 2017). De même, les OMV dérivées de *Vibrio cholerae* ont été utilisées avec succès pour induire une réponse immune médiée par les anticorps en modèle murin (Muralinath *et al.*, 2011) et peuvent être utilisées comme adjuvant afin d'augmenter la réponse antigène-spécifique des anticorps chez la souris (Schild *et al.*, 2009). Enfin, une surexpression de 48 protéines, dont deux protéines spécifiques aux AIEC et quelques facteurs de virulence bactériens, a été mise en évidence dans les OMV de la souche AIEC LF82 comparativement à la souche *E. coli* K12 MG1655 (Boysen *et al.*, 2015), suggérant l'utilité potentielle de ces OMV en tant que vaccin contre les AIEC, mais cette piste reste pour le moment à explorer.

IV.6.2.1.2 Potentiel thérapeutique des vésicules extracellulaires eucaryotes et procaryotes dans les MICI

L'administration d'exosomes issus de différents types cellulaires pourrait permettre de diminuer l'inflammation associée aux MICI en modulant l'activation de différentes populations de lymphocytes T et en améliorant la fonction barrière de l'épithélium intestinal. En effet, les exosomes sécrétés par les cellules suppressives dérivées des cellules myéloïdes diminuent la sévérité de la colite induite au DSS en inhibant la prolifération des Th1 et en favorisant l'expansion des Tregs (Wang *et al.*, 2016e). De même, les exosomes dérivés de cellules dendritiques traitées à l'IL-10 inhibent la mise en place d'une colite chez des rats traités au TNBS *via* la stimulation des cellules Treg CD4⁺ CD25⁺ (Yang *et al.*, 2010) tandis que l'administration d'exosomes sécrétés par des cellules dendritiques exprimant le TGF- β 1 atténue la sévérité de la colite induite au DSS médiée par l'activation des réponses Th17 en induisant l'activation des cellules Treg CD4⁺ Foxp3⁺ (Cai *et al.*, 2012). De manière similaire, le transfert d'exosomes sécrétés par les cellules épithéliales intestinales de souris contrôles à des souris traitées au DSS par injection intraveineuse diminue la sévérité de la colite induite par ce traitement en réduisant le nombre de lymphocytes T CD4⁺ et en

activant les cellules Tregs et les cellules dendritiques immunosuppressives, tandis que l'inhibition de la production d'exosomes *in vivo* augmente la sévérité de la colite induite au DSS (Jiang *et al.*, 2016). De plus, les exosomes sécrétés par les cellules épithéliales intestinales suite à un traitement au DSS contiennent de plus grandes quantités de TGF- β 1 et s'associent avec les molécules d'adhésion EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) exprimées par les cellules épithéliales intestinales murines pour atténuer la sévérité de la colite (Jiang *et al.*, 2016).

D'autres facteurs importants dans la prévention des MICI sont le maintien d'une barrière épithéliale intestinale fonctionnelle et sa restauration suite à des dommages. Les exosomes dérivés des cellules dendritiques améliorent la fonction barrière de l'épithélium intestinal en modèle murin de colite induite au DSS *via* l'activation de la voie NF- κ B par le miARN exosomal 146b (Alexander *et al.*, 2015; Nata *et al.*, 2013). L'annexine A1, surexprimée au cours de la réponse pro-inflammatoire et contribuant significativement à la réparation des dommages de la muqueuse, est retrouvée au sein des exosomes dérivés des cellules épithéliales intestinales et ces exosomes sont capables d'activer la réparation des dommages *in vitro* et *ex vivo* (Leoni *et al.*, 2015). Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté que l'administration intrapéritonéale d'exosomes sécrétés par des cellules souches mésenchymateuses dérivées du cordon ombilical à des souris traitées au DSS diminue le score d'activité de la maladie, la perte de poids, le raccourcissement du côlon et le score histologique en augmentant les réponses anti-inflammatoires et en diminuant les réponses pro-inflammatoires, plus efficacement que les cellules souches mésenchymateuses seules (Ma *et al.*, 2019; Mao *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2018). Ces exosomes exerceraient leur effet sur la colite induite au DSS en régulant le niveau d'ubiquitinylation des protéines (Wu *et al.*, 2018). Enfin, l'injection d'exosomes dérivés des cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux combinée à de la mélatonine, une hormone aux effets anti-inflammatoires, permettrait de limiter l'inflammation dans un modèle de colite induite au DSS chez le rat (Chang *et al.*, 2019).

Certaines plantes comestibles comme le *Curcuma longa* et le raisin peuvent fournir des exosomes pouvant soulager les MICI. Les nanoparticules exosomes-*like* chargées en curcumine et dérivées de la plante médicinale *Curcuma longa* limitent le développement d'une colite en modèle murin de colite induite au DSS, *via* la suppression de l'activation de NF- κ B, la modulation du microbiote intestinal et l'induction de l'expansion des cellules Treg et des cellules dendritiques régulatrices (Ohno *et al.*, 2017). L'administration orale de nanoparticules exosome-*like* issues du jus de raisin protègent les souris de la colite induite au DSS en agissant sur les cellules souches intestinales (Ju *et al.*, 2013). Enfin, les nanoparticules dérivées du gingembre sont majoritairement capturées par les cellules épithéliales intestinales et les macrophages. *In vivo*, ces vésicules diminuent la sévérité de la colite induite au DSS, favorisent la réparation de l'intestin en augmentant la survie et la prolifération des cellules épithéliales intestinales, limitent la sécrétion de cytokines

pro-inflammatoires et favorisent la libération de cytokines anti-inflammatoires, laissant entrevoir leur potentiel dans la prévention et le traitement des MICI (Zhang *et al.*, 2016).

Les OMV sécrétées par les bactéries du microbiote intestinal jouent un rôle important dans la régulation de l'inflammation et des réponses immunitaires (Kang *et al.*, 2013). En effet, une diminution de la diversité des OMV plus drastique que le changement de la composition du microbiote et plus particulièrement une diminution de la quantité d'OMV d'*Akkermansia muciniphila*, a été rapportée dans les fèces de souris suite à un traitement au DSS comparativement aux souris non traitées (Kang *et al.*, 2013). *In vitro*, le pré-traitement de cellules épithéliales intestinales avec les OMV d'*Akkermansia muciniphila* limite l'inflammation induite par une infection par des *E. coli* (Kang *et al.*, 2013). *In vivo*, l'administration concomitante des OMV d'*Akkermansia muciniphila* et du DSS protège les souris contre le développement de la colite (Kang *et al.*, 2013). De manière similaire, les OMV sécrétées par la bactérie du microbiote intestinal *Bacteroides fragilis* peuvent médier des réponses anti-inflammatoires et protéger les souris de la colite expérimentale. En effet, en délivrant le polysaccharide A bactérien aux cellules dendritiques exprimant le récepteur TLR2, ces OMV favorisent l'induction de la conversion des cellules T CD4⁺ naïves en cellules Treg FOXP3⁺ produisant de l'IL-10 anti-inflammatoire (Shen *et al.*, 2012).

L'administration de souches probiotiques ou de leurs OMV pourrait limiter l'inflammation et protéger contre le développement d'une colite. En effet, *in vitro*, les OMV de la souche probiotique *E. coli* Nissle diminuent l'inflammation, améliorent la fonction de barrière des cellules épithéliales intestinales en régulant l'expression des protéines des jonctions serrées (Alvarez *et al.*, 2016) et protègent des dommages à la barrière induits par les *E. coli* entéropathogènes (Alvarez *et al.*, 2019). *In vivo*, ces OMV présentent également un effet anti-inflammatoire sur les cellules intestinales en modèle murin de colite expérimentale induite au DSS (Fábrega *et al.*, 2017). Ainsi, l'administration exogène d'OMV de bactéries du microbiote ou de souches probiotiques pourrait être une piste intéressante permettant de moduler l'inflammation et de prévenir le développement des MICI.

Enfin, les vésicules extracellulaires dérivées de parasites intestinaux pourraient permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les MICI. En effet, certains parasites intestinaux et notamment les ankylostomes possèderaient des propriétés immunosuppressives et ont déjà utilisés dans des essais cliniques pour le traitement des MICI (Croese, 2006; Summers *et al.*, 2005). Les vésicules extracellulaires de taille similaire aux exosomes et sécrétées par le parasite intestinal *Nippostrongylus brasiliensis* affectant les rongeurs contiennent des protéines et des miARN potentiellement porteurs de propriétés immunomodulatrices. L'injection intrapéritonéale de ces vésicules extracellulaires diminue le niveau de cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-1β,

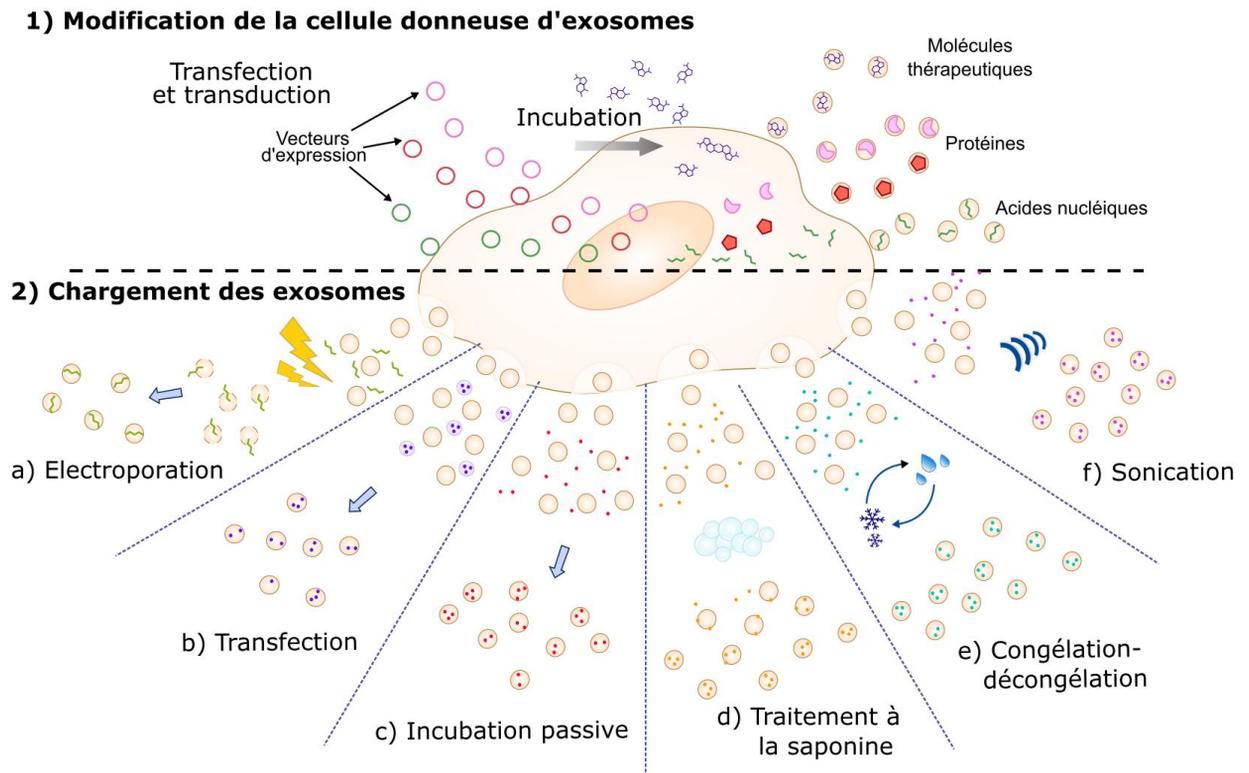


Figure 43 : Représentation des méthodes de chargement des molécules thérapeutiques dans les exosomes.

Les exosomes peuvent être modifiés en manipulant les cellules donneuses ou en chargeant directement les molécules dans les exosomes sécrétés. 1) La modification des cellules donneuses d'exosomes peut être réalisée par incubation directe de celles-ci avec la molécule ou par transfection ou transduction avec des vecteurs d'expression conduisant à la sécrétion d'exosomes contenant la molécule thérapeutique, les protéines ou les acides nucléiques. 2) Le chargement direct des exosomes est réalisé après isolement de ces vésicules. Les molécules thérapeutiques peuvent être chargées dans les exosomes par incubation passive ou par des méthodes actives telles que l'électroporation, la transfection, le traitement à la saponine, des cycles de congélation-décongélation, ou encore la sonication pour favoriser l'incorporation des molécules dans les exosomes.

IFN- γ et IL-17a et augmente le niveau de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 dans le tissu colique de souris traitées au TNBS, prévenant ainsi la mise en place d'une colite (Eichenberger *et al.*, 2018). Les vésicules dérivées de parasites pourraient ainsi permettre le développement de nouvelles thérapies pour les MICI (Eichenberger *et al.*, 2018).

IV.6.2.2 Exosomes et administration de molécules thérapeutiques

Les exosomes sont résistants à la lyse par le complément (Clayton *et al.*, 2003) et par les RNases (Valadi *et al.*, 2007), ce qui leur confère une stabilité *in vivo* en protégeant leur contenu. De ce fait, l'utilisation des exosomes pour l'administration de molécules thérapeutiques a été envisagée (Bunggulawa *et al.*, 2018).

Plusieurs stratégies ont été utilisées afin d'incorporer les molécules thérapeutiques dans les exosomes (**Figure 43**). La première consiste à modifier directement le contenu des exosomes. Cela peut être réalisé par co-incubation directe des exosomes naïfs avec la molécule, une stratégie ayant permis l'incorporation avec succès d'un antioxydant, la curcumine (Sun *et al.*, 2010), d'agents anti-cancéreux tels que la doxorubicine et le paclitaxel (Yang *et al.*, 2015) ou encore d'agents antibactériens comme le linézolide (Yang *et al.*, 2018b), capables d'exercer efficacement leurs effets respectifs *in vivo*. L'électroporation des exosomes a permis l'intégration de certaines molécules d'intérêt telles que la doxorubicine (Tian *et al.*, 2014), un siARN dirigé contre la GAPDH (D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011) ou encore un inhibiteur exogène du miR-155 (Momen-Heravi *et al.*, 2014) capables d'exercer leurs effets dans les cellules réceptrices. Cependant, cette stratégie peut altérer l'intégrité des exosomes et peut présenter une faible efficacité d'incorporation des molécules hydrophobes (Antimisiaris *et al.*, 2018). Les exosomes peuvent par ailleurs être transfectés avec différentes solutions commerciales afin d'y incorporer des siARN, tel que réalisé pour les siARN dirigés contre les protéines *MAPK1* (Wahlgren *et al.*, 2012b), *RAD51* ou *RAD52* (Shtam *et al.*, 2013). Enfin, d'autres techniques telles que le traitement par ultrasons, la perméabilisation par les saponines, la sonication, ou encore la congélation-décongélation ont été utilisées pour le chargement de molécules dans les exosomes (Antimisiaris *et al.*, 2018).

La seconde stratégie d'intégration d'agents thérapeutiques dans les exosomes consiste à traiter les cellules donneuses d'exosomes avec la molécule. L'utilisation de cette approche a permis l'incorporation avec succès de paclitaxel dans les exosomes de cellules stromales donneuses (Pascucci *et al.*, 2014).

Enfin, la troisième stratégie consiste à modifier le génome des cellules donneuses d'exosomes afin qu'elles expriment la protéine thérapeutique alors sécrétée dans les exosomes. Les

exosomes peuvent également directement transporter l'ADN qui servira alors à la synthèse de la molécule thérapeutique dans les cellules réceptrice. Par exemple, l'injection des macrophages transfectés avec de l'ADN plasmidique codant la catalase en modèle murin mimant la maladie de Parkinson a permis de mettre en évidence la sécrétion d'exosomes transportant le matériel génétique codant la catalase et l'expression *de novo* de la catalase dans les neurones receveurs, entraînant une amélioration des fonctions motrices des animaux (Haney *et al.*, 2013). De plus, l'implantation sous-cutanée de cellules HEK-293T génétiquement modifiées pour produire des exosomes contenant l'ARNm de la catalase en modèle murin de la maladie de Parkinson diminue la neuroinflammation (Kojima *et al.*, 2018). De même, l'injection des macrophages transfectés avec l'ADN plasmique codant le GDNF (*glial cell derived neurotrophic factor*) en modèle murin de la maladie de Parkinson atténue la neurodégénérescence et la neuroinflammation associée à la maladie *via* la sécrétion d'exosomes transportant le GDNF par ces macrophages (Zhao *et al.*, 2014). De la même manière, des exosomes issus de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDC) génétiquement modifiées pour exprimer le gène codant pour le TGF- β 1 (exo-TGF- β /BMDC) ont été utilisés pour augmenter les Tregs et supprimer la fonction des cellules Th17, conférant ainsi une protection contre les MICI (Cai *et al.*, 2012). Tandis que le TGF- β est détecté dans les exosomes sécrétés par les exo-TGF- β /BMDC, il ne l'est pas dans les exosomes des cellules dendritiques non modifiées. L'administration de 10 μ g d'exosomes contenant le TGF- β par voie intraveineuse à des souris traitées ensuite au DSS permet de prévenir la perte de poids, de réduire les saignements intestinaux et le score d'activité de la maladie, tandis que l'administration de la cytokine TGF- β ne confère aucune protection contre la colite. Les effets positifs des exosomes sur la colite résultent probablement du fait de la stabilité du TGF- β au sein des exosomes, et de l'augmentation du nombre et de l'activité des Tregs induite par ces vésicules (Cai *et al.*, 2012). Cependant, bien que capables de prévenir le développement d'une colite, les exosomes contenant le TGF- β ne peuvent pas inhiber la progression de la colite après le début de la maladie (Cai *et al.*, 2012).

SECONDE PARTIE
– Travail Expérimental –

I. Contexte scientifique

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique du tube digestif dont l'étiologie fait intervenir des facteurs environnementaux, génétiques et infectieux. Parmi ces derniers se trouvent les souches d'*E. coli* adhérents et invasifs (AIEC) colonisant anormalement la muqueuse intestinale des patients atteints de MC. Les AIEC sont capables d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales, de survivre et se multiplier au sein des macrophages, de coloniser le tube digestif et d'induire une inflammation intestinale chez des souris génétiquement prédisposées (Palmela *et al.*, 2017).

Il a été montré par le laboratoire que l'autophagie est un mécanisme clé de la défense de l'hôte pour l'élimination des bactéries AIEC intracellulaires et la diminution de l'inflammation intestinale induite par ces dernières (Brest *et al.*, 2011; Bretin *et al.*, 2016, 2018; Dalmaso *et al.*, 2019; Lapaquette *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2014). Cependant, le ou les récepteur(s) autophagique(s) impliqué(s) dans le ciblage des AIEC aux autophagosomes ainsi que le mécanisme sous-jacent restent à identifier.

Il a été récemment montré par le laboratoire que les cellules infectées par les AIEC sécrètent des exosomes qui entraînent à leur tour une augmentation de la réplication des AIEC et de l'inflammation dans les cellules réceptrices (Carrière *et al.*, 2016a). Cependant, le mécanisme sous-jacent reste à identifier. L'autophagie étant cruciale pour contrôler la multiplication intracellulaire des AIEC, nous avons émis l'hypothèse que les exosomes sécrétés par les cellules infectées par les AIEC inhibent l'autophagie dans les cellules réceptrices.

Ainsi, les travaux menés au cours de cette thèse ont eu pour objectif principal d'identifier le mécanisme moléculaire par lequel les exosomes augmentent la réplication intracellulaire des AIEC dans les cellules réceptrices, et d'identifier le ou les récepteur(s) autophagique(s) mis en jeu dans la reconnaissance des AIEC par l'autophagie.

II. Résultats principaux obtenus

II.1 Identification du mécanisme moléculaire par lequel les exosomes augmentent la réplication intracellulaire des AIEC au sein des cellules réceptrices

Au cours de cette étude, nous avons utilisé les exosomes sécrétés par les cellules épithéliales intestinales humaines T84 infectées par la souche AIEC LF82 pour stimuler des cellules épithéliales intestinales réceptrices, puis l'impact sur l'autophagie a été analysé par western blot. Les exosomes sécrétés par les cellules épithéliales intestinales infectées par la souche AIEC LF82 entraînent une diminution de LC3-II, un marqueur de l'induction de l'autophagie, par rapport aux exosomes sécrétés par les cellules non infectées ou infectées avec la souche *E. coli* non pathogène K12 ou la souche *E. coli* commensale HS. Ces résultats suggèrent que les exosomes sécrétés par les cellules infectées par les bactéries AIEC pourraient inhiber l'autophagie dans les cellules réceptrices.

Une étude précédente menée au laboratoire a révélé que suite à l'infection par les bactéries AIEC, le niveau des miR-30c et miR-130a est augmenté dans les cellules épithéliales intestinales, inhibant l'expression d'ATG5 et ATG16L1 respectivement et donc l'induction de l'autophagie (Nguyen *et al.*, 2014). Nous avons supposé que ces miARN pourraient être intégrés dans les exosomes et transférés aux cellules réceptrices dans lesquelles ils pourraient inhiber l'expression d'ATG5 et ATG16L1 et donc l'autophagie. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons isolé les exosomes sécrétés par les cellules T84 infectées par la souche AIEC LF82 et analysé le niveau de ces miARN dans ces exosomes par RT-PCq. En effet, le niveau de ces deux miARN était augmenté dans les exosomes sécrétés par les cellules infectées par la souche AIEC LF82 par rapport à ceux sécrétés par les cellules non infectées ou infectées par la souche *E. coli* commensale HS. De plus, ces miARN ont été transférés aux cellules T84 *via* les exosomes, ciblant ainsi la région 3'-UTR des ARNm *ATG5* et *ATG16L1* respectivement. Par conséquent, les exosomes sécrétés par les cellules infectées par la souche AIEC LF82 entraînent une inhibition de l'expression d'ATG5 et ATG16L1, et ainsi de l'autophagie, dans les cellules réceptrices. Les exosomes dérivés de cellules infectées par les bactéries AIEC et transfectées avec des anti-sens des miR-30c et miR-130a ne sont plus capables d'inhiber l'autophagie et d'augmenter la réplication intracellulaire des bactéries AIEC dans les cellules réceptrices.

Ces résultats ont permis de montrer que les miARN 30c et 130a sont transférés *via* les exosomes de cellule en cellule pour inhiber la réponse autophagique de l'hôte, favorisant ainsi la colonisation par les bactéries AIEC.

Ces travaux ont donné lieu à la soumission d'un manuscrit dans le journal Gut Microbes : Larabi A., Dalmaso G., Delmas J., Barnich N., Nguyen H.T.T., Exosomes transfer miRNAs from cell-to-cell to inhibit autophagy during infection with Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli*.

**Exosomes transfer miRNAs from cell-to-cell to inhibit autophagy during infection with
Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli***

Anaïs Larabi¹, Guillaume Dalamasso¹, Julien Delmas^{1,2}, Nicolas Barnich¹, Hang Thi Thu Nguyen¹.

¹M2iSH, UMR 1071 Inserm, University of Clermont Auvergne, INRA USC 2018, CRNH, Clermont-Ferrand 63001, France.

²Department of Bacteriology, CHU Gabriel Montpied, Clermont-Ferrand, France.

***Address correspondence to:** Hang Nguyen, PhD. M2iSH, UMR 1071 Inserm, University of Clermont Auvergne, INRA USC 2018, Clermont-Ferrand 63001, France.

Tel: (+33) 4 73 17 83 72. Fax: (+33) 4 73 17 83 71. E-mail: hang.nguyen@uca.fr.

Short title: Exosomal miRNAs inhibit autophagy during AIEC infection

Abstract

Adherent-invasive *E. coli* (AIEC), which abnormally colonize the intestinal mucosa of Crohn's disease (CD) patients, are able to adhere to and invade intestinal epithelial cells (IECs), survive and replicate within macrophages and induce a pro-inflammatory response. AIEC infection of IECs induces secretion of exosomes that increase immune response and AIEC replication in exosome-receiving IECs and macrophages. Here, we investigated the mechanism underlying the increased AIEC replication in cells receiving exosomes from AIEC-infected cells. Exosomes released by uninfected human intestinal epithelial T84 cells (Exo-uninfected) or by T84 cells infected with the clinical AIEC LF82 strain (Exo-LF82), the non-pathogenic *E. coli* K12 strain (Exo-K12) or the commensal *E. coli* HS strain (Exo-HS) were purified and used to stimulate T84 cells. Stimulation of T84 cells with Exo-LF82 inhibited autophagy compared with Exo-uninfected, Exo-K12 and Exo-HS. qRT-PCR analysis revealed increased levels of miR-30c and miR-130a in Exo-LF82 compared to Exo-uninfected, Exo-K12 and Exo-HS. These miRNAs were transferred *via* exosomes to recipient cells, in which they targeted and inhibited ATG5 and ATG16L1 expression and thereby autophagy response, thus favoring AIEC intracellular replication. Inhibition of these miRNAs in exosome donor cells infected with AIEC LF82 abolished the increase in miR-30c and miR-130a levels in the released Exo-LF82 and in Exo-LF82-receiving cells, thus suppressing the inhibitory effect of Exo-LF82 on ATG5 and ATG16L1 expression and on autophagy-mediated AIEC clearance in Exo-LF82-receiving cells. Our study shows that upon AIEC infection, IECs secrete exosomes that can transfer specific miRNAs to recipient IECs, inhibiting autophagy-mediated clearance of intracellular AIEC.

Keywords: Crohn's disease; AIEC; Exosomes; MiRNA; Autophagy.

Introduction

Crohn's disease (CD) is an inflammatory bowel disease with a multifactorial etiology, involving a complex interaction between environmental, genetic and microbial factors ^{1,2}. An intestinal dysbiosis has been reported in CD patients, characterized by a decrease in the number of beneficial bacteria such as members of the *Firmicutes* phylum and an increase in potentially harmful bacteria such as those from the *Enterobacteriaceae* family. In particular, our group and others have reported a high prevalence of pathogenic adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) strains in the ileal mucosa of CD patients ³⁻⁶. The CD-associated AIEC strains have been shown to adhere to and to invade intestinal epithelial cells (IECs) ⁷⁻⁹, to survive and replicate within macrophages ¹⁰ with an increase in the macrophages from CD patients compared to those from healthy controls ¹¹, to promote pro-inflammatory cytokine production, and to colonize the gut and induce intestinal inflammation in genetically susceptible mouse models ^{12,13}.

Autophagy, a lysosomal degradation process, has emerged as a key player for the maintenance of intestinal homeostasis and gut ecology, the protection against microbes and the control of appropriate intestinal immune responses ¹⁴. Efforts have been made to reveal the mechanisms by which dysfunctional autophagy predisposes to CD development ¹⁵. Among those, a defect in autophagy has been shown to result in impaired clearance of pathogenic bacteria including CD-associated AIEC, which is associated with aberrant immune responses ^{8,9,12,16-19}. Reversely, we reported that AIEC bacteria can limit their elimination by the autophagy machinery of the host by increasing the level of microRNAs (miRNA, miR) 30c and 130a to suppress expression of ATG (Autophagy-related) 5 and ATG16L1, respectively, two key players of autophagy induction ⁸. This consequently favors the intestinal colonization of AIEC and increases AIEC-induced inflammation *in vitro* and *in vivo* ⁸. Given that miR-30c and miR-130a are upregulated in CD ⁸, dysfunctional autophagy might not be

only caused by CD-associated risk variants in autophagy-related genes, but also by the epigenetic factors that negatively regulate expression of autophagy-related genes.

Recently, our group highlighted a previously uncovered function of exosomes, small extracellular vesicles with a diameter of 30 to 100 nm²⁰, in cell-to-cell communication during AIEC infection²¹. Exosomes are released from a broad range of cell types and are found in most bodily fluids²⁰. Exosomes play a role in cell-to-cell communication by transferring lipids, proteins and genetic material such as mRNA and miRNAs from a donor cell to a recipient cell²⁰. Moreover, the exosomal content is functional when being transferred to recipient cells, in which the exosomal mRNAs are translated into proteins^{22,23} and exosomal miRNAs are able to silence target genes²⁴⁻²⁶. Thus, exosomes have been implicated in many physiopathological functions, such as signaling, immunity and infections²⁰. In the context of AIEC infection, we reported that AIEC infection promotes the secretion of exosomes by infected cells, which are in turn uptaken by naïve cells, leading to increased pro-inflammatory response and impaired clearance of intracellular AIEC²¹. The mechanisms underlying the effects of exosomes in recipient cells, however, remain unknown.

Since a functional autophagy is required to restrain the intracellular replication of AIEC¹⁹, we hypothesized that the increased AIEC replication in the cells that receive exosomes released from AIEC-infected IECs is due to impaired autophagy. Thus, in the current study, we aimed at investigating whether miR-30c and miR-130a, which were previously shown to be upregulated in AIEC-infected cells⁸, are packaged in exosomes and transferred to recipient cells to inhibit ATG5 and ATG16L1 expression, limiting autophagy-mediated clearance of intracellular AIEC.

Results

Exosomes released from AIEC LF82-infected IECs inhibit autophagy in recipient IECs.

We previously reported that exosomes secreted by AIEC-infected human intestinal epithelial T84 cells increase intracellular AIEC replication and inflammation in exosome-receiving cells ²¹. Since a functional autophagy is required to restrain the intracellular replication of AIEC ¹⁹, we hypothesized that exosomes released from AIEC-infected cells may inhibit autophagy in recipient cells, thus leading to abnormal AIEC replication. To confirm this, we purified exosomes secreted by uninfected T84 cells (designated as Exo-uninfected) or by T84 cells infected with the AIEC LF82 reference strain (designated as Exo-LF82) or the non-pathogenic *E. coli* K12 strain (designated as Exo-K12) or the commensal *E. coli* HS strain (designated as Exo-HS) for 12 h as previously described ²¹. Western blot analysis showed that the purified exosomes contained the exosomal marker CD63 and CD9 but did not carry the negative marker GRP94, which was detected only in T84 cell lysate (**Figure 1A**). T84 cells were then stimulated with the purified exosomes, and western blot analysis for the shift of LC3-I (microtubule associated protein 1 light chain 3; the free cytosolic form) to LC3-II (the form conjugated to phagophore and autophagosome), an indication of autophagy induction ²⁷, was performed. Upon stimulation with Exo-LF82, T84 cells exhibited decreased LC3-II level, suggesting impaired autophagy, compared with cells receiving Exo-uninfected, Exo-K12 or Exo-HS (**Figure 1B, C**). Inhibition of autophagy by Exo-LF82 was confirmed by the concomitant increase in p62/SQSTM1 (sequestosome 1), a receptor protein degraded by functional autophagy ²⁷ (**Figure 1B, C**). Furthermore, Exo-LF82 also inhibited LC3-II level and p62 degradation compared to Exo-uninfected, Exo-K12 or Exo-HS in T84 cells infected with the AIEC LF82 strain (**Figure 1D, E**). These results suggest that exosomes derived from AIEC-infected cells may inhibit autophagy in exosome-receiving cells at basal level or following AIEC infection.

MiR-30c and miR-130a levels are increased in the exosomes released from AIEC LF82-infected IECs and in exosome-receiving IECs.

Our previous study demonstrated that upon AIEC infection, the levels of miR-30c and miR-130a are increased in host IECs, thus inhibiting expression of ATG5 and ATG16L1, respectively, and subsequently impairing autophagy⁸. As previously observed, qRT-PCR analysis showed increased levels of miR-30c and miR-130a in T84 cells in response to AIEC LF82 infection compared to uninfected IECs or IECs infected with the K12 MG1655 or *E. coli* HS strains (**Figure 2A**). We hypothesized that in response to AIEC infection, miR-30c and miR-130a were packaged in exosomes and transferred to recipient cells, in which they inhibit ATG5 and ATG16L1 expression and suppress autophagy. To confirm this, exosomes secreted from uninfected T84 cells or T84 cells infected with the AIEC LF82, or K12 MG1655 or *E. coli* HS strain were purified, and the levels of miR-30c and miR-130a in these exosomes were analyzed by qRT-PCR. As shown in **Figure 2B**, the levels of miR-30c and miR-130a were significantly increased in Exo-LF82 compared to Exo-uninfected, Exo-K12 or Exo-HS.

Furthermore, T84 cells stimulated with Exo-LF82 exhibited increased miR-30c and miR-130a levels compared with those receiving Exo-uninfected, Exo-K12 or Exo-HS (**Figure 2C**). This suggests that these miRNAs were transferred from exosomes to recipient cells.

MiR-30c and miR-130a are efficiently transferred via exosomes from donor cells to recipient cells, where they target and inhibit ATG5 and ATG16L1 expression.

To demonstrate that miR-30c and miR-130a are directly transferred from cell-to-cell via exosomes, we transfected T84 cells with Alexa Fluor 555-labeled-miR-30c or Alexa Fluor 555-labeled-miR-130a, then extracted the released exosomes. Naïve T84 cells were then

incubated with the purified exosomes. Confocal microscopic analysis clearly showed the localization of Alexa Fluor 555-labeled miRNAs inside exosome-receiving cells (**Figure 3A, B**), indicating that these miRNAs are successfully transferred from donor cells to recipient cells *via* exosomes.

We next examined whether miR-30c and miR-130a transferred from exosomes can regulate ATG5 and ATG16L1 expression in recipient cells. Naïve T84 cells were transfected with a construct in which the 3'-UTR of *ATG5* or *ATG16L1* mRNA was cloned downstream a luciferase-coding sequence in the pMIR-REPORTTM luciferase vector (designated as *ATG5*-3'-UTR-luc or *ATG16L1*-3'-UTR-luc construct, respectively). Transfected cells were then stimulated with Exo-uninfected, Exo-K12, Exo-HS or Exo-LF82. Exo-LF82 significantly reduced luciferase activity in recipient cells transfected with *ATG5*-3'-UTR-luc or *ATG16L1*-3'-UTR-luc construct compared to Exo-uninfected, Exo-K12 or Exo-HS, indicating that the exosomal miR-30c and miR-130a bind to the 3'-UTRs of *ATG5* and *ATG16L1* mRNAs, respectively (**Figure 4A**). However, in cells transfected with the empty luciferase reporter, luciferase activity was not reduced upon stimulation with Exo-LF82 compared to Exo-uninfected, Exo-K12 or Exo-HS, indicating the specificity of binding between the exosomal miR-30c and miR-130a to the 3'-UTRs of *ATG5* and *ATG16L1* mRNAs, respectively (**Figure 4A**). Importantly, T84 cells receiving Exo-LF82 exhibited significantly reduced levels of *ATG5* and *ATG16L1* mRNAs compared to those receiving Exo-uninfected, Exo-K12 or Exo-HS, as analyzed by qRT-PCR (**Figure 4B**). Furthermore, western blot analysis revealed a significant reduction of ATG5 and ATG16L1 protein expression in cells receiving Exo-LF82 compared to that in cells receiving Exo-uninfected, Exo-K12 or Exo-HS (**Figure 4C**).

Together, these results show that upon AIEC infection, host cells can release exosomes that transfer miR-30c and miR-130a to recipient cells to inhibit expression of their

target genes *ATG5* and *ATG16L1* at both mRNA and protein levels, by directly targeting the 3'-UTRs of *ATG5* and *ATG16L1* mRNAs.

Inhibition of miR-30c and miR-130a in AIEC LF82-infected cells abolishes the increase in miR-30c and miR-130a levels in the released exosomes and in exosome-receiving cells.

To further demonstrate that the inhibitory effect of Exo-LF82 on autophagy in exosome-receiving cells is dependent of miR-30c and miR-130a, we inhibited the levels of these miRNAs using their antisenses (designated as anti-miR-30c and anti-miR-130a) in T84 donor cells uninfected or infected with LF82 or *E. coli* HS strain, and examined the effect of exosomes released by these cells on autophagy in recipient cells. As shown in **Figure 5A**, in T84 cells transfected with the anti-miR negative control (anti-miR-NC), LF82 infection led to an increase in miR-30c and miR-130a levels compared to *E. coli* HS infection or uninfected condition. However, in cells transfected with anti-miR-30c and anti-miR-130a, this increase was abolished (**Figure 5A**).

Furthermore, naïve T84 cells were transfected with *ATG5*-3'-UTR-luc or *ATG16L1*-3'-UTR-luc construct and then incubated with Exo-uninfected, Exo-HS or Exo-LF82 released from cells transfected with anti-miR-NC or a combination of anti-miR-30c and anti-miR-130a. In cells receiving the exosomes from anti-miR-NC-transfected cells, reduced luciferase activity was observed upon incubation with Exo-LF82 compared to Exo-uninfected or Exo-HS (**Figure 5B**). This result, which was in agreement with the data in Figure 4A, indicates that increased levels of miR-30c and miR-130a in Exo-LF82 derived from anti-miR-NC-transfected cells were transferred to exosome-receiving cells, where they bind to the target 3'-UTRs of *ATG5* and *ATG16L1* mRNAs. However, in cells receiving the exosomes from cells transfected with anti-miR-30c and anti-miR-130a, no significant difference in luciferase activity upon incubation with Exo-uninfected, Exo-HS or Exo-LF82 was observed (**Figure**

5B). This suggests that the inhibition of miR-30c and miR-130a in exosome donor cells abolishes the increase in the levels of these miRNAs in cells receiving Exo-LF82 *versus* Exo-uninfected or Exo-HS. As expected, miR-30c and miR-130a were detected at very low levels in Exo-uninfected, Exo-HS and Exo-LF82 derived from cells transfected with anti-miR-30c and anti-miR-130a with no significant difference (data not shown). Importantly, Exo-LF82 derived from cells transfected with anti-miR-NC can increase miR-30c and miR-130a levels in recipient cells compared to Exo-uninfected or Exo-HS, and this effect was not observed for Exo-LF82 derived from cells transfected with anti-miR-30c and anti-miR-130a (**Figure 5C**).

Together, these data show that inhibition of miR-30c and miR-130a in AIEC LF82-infected donor cells abolishes the increase in miR-30c and miR-130a levels in the released exosomes and in exosome-receiving cells.

Inhibition of miR-30c and miR-130a in AIEC-infected donor cells abolishes the inhibitory effect of exosomes on ATG5 and ATG16L1 expression, and consequently on autophagy-mediated AIEC clearance in recipient cells.

Exo-LF82 released from anti-miR-NC-transfected cells, compared to Exo-uninfected and Exo-HS, triggered decreased expression of ATG5 and ATG16L1 at both mRNA and protein levels (**Figure 6A-C**) and inhibited autophagy response, as shown by decreased LC3-II level (**Figure 6B, C**) in recipient cells. This subsequently led to increased LF82 intracellular replication, presented as percentage of LF82 CFU determined at 24 h *versus* 4 h post-infection, defined as 100% (**Figure 6D**). The CFU of LF82 determined at 4 h post-infection in the cells that received Exo-LF82, Exo-uninfected and Exo-HS were not different (data not shown). Transfection of donor cells with anti-miR-30c and anti-miR-130a abolished the inhibitory effects of Exo-LF82 on expression of ATG5 and ATG16L1 (**Figure 6A-C**) and on autophagy response (**Figure 6B, C**) in recipient cells. This resulted in an efficient

clearance of intracellular LF82 in cells receiving Exo-LF82 compared to Exo-uninfected or Exo-HS since similar levels of LF82 intracellular replication in these cells were observed **(Figure 6D)**.

Together, these data show that during AIEC infection, the inhibitory effect of exosomes on autophagy in recipient cells is mediated by miR-30c and miR-130a, which are transferred from donor cells to recipient cells *via* exosomes.

Discussion

In recent years, significant progresses have been made in elucidating the mechanistic network underlying the role of exosomes in antibacterial defense, immunity and pathogenesis of several human diseases²⁰. We recently showed that exosomes are new mediators of host-AIEC interaction with their capacity to trigger a pro-inflammatory response and promote AIEC intracellular replication in exosome-recipient cells²¹. However, the mechanisms behind the functional effects of exosomes on recipient cells remain unknown. In the current study, we showed that the exosomal shuttle can transfer specific miRNAs from cells to cells during AIEC infection, which leads to impaired autophagy-mediated clearance of intracellular AIEC.

Exosomes has been emerged as an important intermediator participating in cellular crosstalk during pathogen infection by delivering their content composed of proteins, lipids, and RNAs. It has been shown that exosomes can directly transfer pathogen-related molecules from cells to cells, thereby impacting the infection progress²⁸. For example, exosomes from *Bacillus anthracis*-infected cells can transport the lethal toxin virulence factor to naïve cells²⁹. Similarly, gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori* secrete exosomes that carry CagA, encoded by cytotoxin-associated gene A (cagA), a major virulence factor of the bacterium. Furthermore, CagA-carrying exosomes can enter the circulation and deliver CagA to distant organs and tissues³⁰. In gastric epithelial cells, the exosomes isolated from the serum of patients exhibiting a chronic gastritis and infected with *Helicobacter pylori* are able to induce the expression of the soluble IL-6 receptor, which increase IL-1 α expression³¹. It has been reported that *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages release extracellular vesicles including exosomes that can deliver pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), such as mycobacterial proteins, lipids, and nucleic acids, to naïve macrophages, activating or inhibiting immune responses^{23,32-35}. Moreover, exosomes from *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages or from the serum of *Mycobacterium*

tuberculosis-infected mice can activate endothelial cells, suggesting a role of these exosomes in promoting leukocyte adhesion and cell migration as well as inflammation upon *Mycobacterium tuberculosis* infection³⁵. However, the exosomal components responsible for these effects remain to be identified. Regarding the exosomal miRNAs, increasing evidence has highlighted the effect of pathogen infection on the miRNA composition of host cell-derived exosomes, which may have an impact on exosome-receiving cells and host immune responses, thus inhibiting the infection or, on the contrary, promoting the immune escape of the pathogen²⁸. In the context of viral infection, exosomes secreted by epithelial cells infected with *Newcastle disease virus*, a zoonotic virus affecting all species of birds, exhibit increased levels of miR-1273f, miR-1184 and miR-198²⁴. These exosomal miRNAs inhibit interferon pathway in exosome recipient cells, thus promoting viral infection²⁴. Similarly, the infection of HT-29 colon cancer cells by *enterovirus 71* induces the secretion of exosomes that can transfer miR-146a to recipient cells, in which this miRNA inhibits expression of IRAK1, TRAF6 and STAT1, thus suppressing IFN production and helping *enterovirus 71* infection³⁶. Conversely, exosomes derived from broncho-alveolar lavage fluid of mice infected with *Influenza* virus display an increased level of miR-483-3p that exacerbates pro-inflammatory and anti-viral responses in recipient lung epithelial cells *in vitro*³⁷. In the context of bacterial infection, it was shown that upon lipopolysaccharide (LPS) exposure, miR-155 and miR-146a are released into exosomes from murine bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) and are efficiently transferred to recipient BMDC²⁵. Upon being uptaken, these miRNAs mediate target gene repression to modulate inflammatory gene expression and reprogram cellular response to endotoxins²⁵. Similarly, exosomes derived from the serum of a sepsis-related lung injury mouse model established by intraperitoneal injection of LPS are selectively enriched in miR-155³⁸. *In vitro*, these exosomes stimulate NF- κ B activation and induce production of TNF- α and IL-6, and also favor macrophage proliferation. *In vivo*, the

intravenous injection of these exosomes to naïve mice increased the number of pro-inflammatory M1 macrophages in the lungs and induce lung inflammation³⁸. MiR-155 level is also found increased in exosomes derived from *Helicobacter pylori*-infected macrophages, and this exosomal miRNA regulates inflammatory responses in exosome-receiving macrophages to limit *H. pylori* replication and prevent the gastritis caused by *H. pylori* infection³⁹. Likewise, upon infection of macrophages with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette–Guerin (BCG), the miRNA content of macrophage-derived exosomes is altered⁴⁰. *In silico* analysis suggested that the differentially expressed exosomal miRNAs may subvert host metabolic pathway to enable BCG survival within infected macrophages⁴⁰. So far, a role for exosomal miRNAs in modulating autophagy in exosome-receiving cells has not been reported.

In our study, we showed that exosomes secreted by AIEC LF82-infected human intestinal epithelial T84 cells exhibited an increased level of miR-30c and miR-130a compared with exosomes secreted by uninfected cells or cells infected with non-pathogenic *E. coli* strains. These miRNAs were efficiently transferred *via* exosomes from donor T84 cells to recipient cells, in which they directly targeted the 3'-UTRs of *ATG5* and *ATG16L1* mRNAs, thus inhibiting *ATG5* and *ATG16L1* expression at both mRNA and protein levels. This consequently resulted in impaired autophagy-mediated clearance of AIEC bacteria. Thus, along with other studies, our results showed that bacterial infection-induced miRNA transfer within exosomes play a role in cell-to-cell communication *via* modulating innate immune responses, thus favoring pathogen survival.

To further confirm that the observed effects are specifically dependent of miR-30c and miR-130a, we inhibited the levels of these miRNAs in exosome-donor cells and the functional consequences of this inhibition were examined. We showed that inhibition of miR-30c and miR-130a in exosome-donor cells before AIEC LF82 infection abolished the increase in their

levels in the secreted exosomes and subsequently in exosome-receiving cells. As a consequence, the inhibitory effects of the exosomes secreted from LF82-infected cells on autophagy in exosome-receiving cells were not observed, thus autophagy was sustained and LF82 intracellular replication was well controlled. Collectively, these results indicate that the exosomal miR-30c and miR-130a, increased in response to AIEC infection, are sufficient to impair autophagy in exosome-receiving cells, thus leading to increased AIEC intracellular replication.

Together with our previous study showing that AIEC can subvert host autophagy response by upregulating the levels of miR-30c and miR-130a to replicate inside host cells, we propose that AIEC dysregulate host miRNAs to inhibit autophagy, and this can be amplified from cell to cell *via* the exosomal shuttle, thus favoring AIEC colonization (**Figure 7**). This importantly suggests that the loss of tightly regulated autophagy in handling the CD-associated AIEC caused by miRNA dysregulation, which might contribute to the pathogenesis of CD, could happen at local and distant sites in a host. This should be kept in mind while developing future personalized strategies to treat CD patients with AIEC abnormal colonization.

Materials and methods

Bacterial strains

The AIEC LF82 reference strain isolated from a chronic ileal lesion of a CD patient ⁷, the non-pathogenic *E. coli* K-12 MG1655 strain and the commensal *E. coli* O9:H4 strain (*E. coli* HS) ⁴¹ were used. Bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) broth (Pronadisa) overnight at 37°C without shaking.

Cell culture

Human intestinal epithelial T84 cells (ATCC CCL-248TM) were maintained in an atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C in a Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient F-12 HAM culture medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Dutscher), 1% L-glutamine (Gibco), 1% minimal essential medium vitamins 100X free from L-Glutamine (Dutscher), and 1% antibiotic and antimycotic solution (10,000 U of penicillin, 10 mg of streptomycin, and 0.025 mg of amphotericin B per mL; GE Healthcare HyClone).

Bacterial infection of human T84 cells and determination of intracellular bacterial number using gentamicin protection assay

For exosome extraction, T84 cells were seeded on 150 cm² cell culture flask (Falcon) and infected with a multiplicity of infection (MOI) of 10. T84 cells were maintained in contact with bacteria for 3 h in culture medium without antibiotics (infection medium). Then, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS; Gibco) and incubated for 9 h with culture medium containing 10% exosome-depleted FBS (System Biosciences, Mountain View, CA) instead of regular FBS to avoid coextraction of bovine exosomes and 100 µg/mL of gentamicin (Euromedex) to remove extracellular bacteria.

For infection of exosome-receiving cells, T84 cells were seeded on 12-well or 24-well plates (Falcon), stimulated with exosomes (80 µg of exosome per 1 ml of culture medium) for 8 h and infected with a MOI of 10. Cells were maintained in contact with bacteria for 3 h in infection medium and were washed with PBS. Cells were then incubated with infection medium containing 100 µg/mL of gentamicin for the indicated time.

Invasion assay was performed as described previously ⁸. Briefly, cells were lysed using 1% Triton X-100 (Euromedex) in deionized water. Serial dilutions of samples were made and plated onto LB agar plate, and the number of colony-forming units (CFU) was counted to determine the number of intracellular bacteria.

Isolation of exosomes from cell culture supernatant

Twelve hours after infection, supernatant of infected cells was collected, and exosomes were extracted using the ExoQuickTM Exosome Precipitation Solution (System Biosciences) following the manufacturer's protocol. Briefly, supernatant was centrifuged at 3,000 g for 15 min to eliminate cell debris. Then, supernatant was passed through a Mustang E membrane 0.2-µm pore size filters (Pall Corporation) to remove bacterial lipopolysaccharide and microvesicles larger than exosomes. ExoQuickTM was added to the supernatant with a volume ratio of 1:5, the suspension was mixed by inverting the tubes and incubated at 4°C overnight. Finally, the suspension was centrifuged at 1,500 g for 30 min to pellet the exosomes.

Protein extraction and western blot analysis

T84 cells or purified exosomes were lysed in radioimmuno precipitation assay (RIPA) lysis buffer containing 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 0.1% Nonidet P-40, and supplemented with protease inhibitors

(Roche). Proteins were quantified using Bio-Rad DCTM protein assay kit according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad).

Cell and exosome lysates were separated on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membranes, blocked in 5% bovine serum albumin (BSA) in PBS containing 0.1% Tween-20 and then probed with appropriate primary antibodies: anti-CD63 (EXOAB-CD63A-1, System Biosciences), anti-CD9 (EXOAB-CD9A-1, System Biosciences), anti-GRP94 (sc-11402, Santa Cruz), anti-ATG16L1 (#8089, Cell Signaling Technology), anti-ATG5 (#12994, Cell Signaling Technology), anti-LC3 (L7543, Sigma), anti-p62/SQSTM1 (sc-28359, Santa Cruz) and anti- β -actin (#4970, Cell Signaling Technology). After washes, membranes were incubated with the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Cell Signaling Technology and System Biosciences), and blots were revealed using the Clarity Western enhanced chemiluminescence detection kit (Bio-Rad) and the ChemiDocTM XRS System (BioRad).

In vitro transfection and luciferase assay

Anti-miR negative control #1 and antisenses of miR-30c and miR-130a were purchased from Ambion. T84 cells were transfected with 50 nM of antisenses of miRNAs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and Opti-MEM I reduced serum medium (Invitrogen) 24 h before being infected with AIEC LF82, *E. coli* K12 MG1655 or *E. coli* HS strain for 12 h. Exosomes were purified from the culture supernatant of these cells and designated as Exo-uninfected, Exo-LF82, Exo-K12 and Exo-HS.

The 3'-untranslated regions (UTRs) of human *ATG5* and *ATG16L1* mRNAs were cloned into the pMIR-REPORTTM Luciferase vector (Ambion) to generate *ATG5*-3'-UTR-luciferase or *ATG16L1*-3'-UTR-luciferase construct, respectively, as previously described⁸. For luciferase assay, T84 cells were seeded on 48-well plate. Twenty-four hours later, cells

were transfected with 750 ng of *ATG5*-3'-UTR-luciferase or *ATG16L1*-3'-UTR-luciferase construct or of the pMIR-REPORTTM Luciferase vector, and 16 h after transfection the cells were stimulated with 80 µg of exosomes per 1 ml of culture medium for 8 h. Firefly luciferase activity was measured using the dual-luciferase reporter assay system (Promega) and a Luminoskan Ascent luminometer (Thermo Electron Corp.). Relative luciferase activity was normalized to µg of protein, determined from cell lysate using Bio-Rad DCTM protein assay kit according to the manufacturer's instructions (BioRad).

RNA extraction, cDNA synthesis and quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis

Total RNAs were extracted from purified exosomes or cultured cells using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. For exosomal samples, 25 fmol of each spike-in controls *Caenorhabditis elegans* cel-mir-39-3p, cel-mir-54-3p and cel-mir-238-3p (mirVanaTM miRNA mimic, Life Technologies) were added into the lysis solution per extraction.

Total RNAs were reversely transcribed using the miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Agilent) to quantify mature miRNA levels or the PrimeScript RT Reagent Kit (Takara) to quantify mRNA expression levels. qRT-PCR was performed using SsoAdvancedTM Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) on a CFX96 TouchTM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) using specific primers listed in **Table S1**. For quantification of mature miRNA expression, the universal reverse primer provided in the miRNA 1st Strand cDNA Synthesis kit was used with the specific forward primers indicated in **Table S1**. Spike-in controls cel-mir-39-3p, cel-mir-54-3p and cel-mir-238-3p or U6 were used as internal controls for quantification of miRNAs in exosomes or in cells, respectively. Human 18S was used as internal control for mRNA quantification in cells. Fold-induction was calculated using the comparative threshold cycle number (Ct) method as follows: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target mRNA/miRNA}} -$

$C_{t(\text{internal control})\text{condition of interest}} - (C_{t(\text{target mRNA/miRNA}} - C_{t(\text{internal control})\text{control condition}}$, and the final data were derived from $2^{-\Delta\Delta C_T}$. When spike-in controls cel-mir-39-3p, cel-mir-54-3p and cel-mir-238-3p were added into samples and used as internal controls, the average of Ct of these 3 miRNAs was used as $C_{t(\text{internal control}}$.

Fluorescent microscopy

T84 cells were transfected with AlexaFluor555-labeled-miR-30c or AlexaFluor555-labeled-miR-130a (Ambion) for 24 h, and uninfected or infected with the AIEC LF82 strain or the *E. coli* K12 or *E. coli* HS strain with a MOI of 10 for 12 h. The supernatant of these cells were collected and exosomes were purified. T84 cells seeded on coverslips were stimulated with the purified exosomes (80 μg exosome/mL of culture medium) for 8 h. Cells were then fixed with 4% formaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min, saturated with PBS containing 0.025% Triton X-100, 3% BSA and 5% FBS for 1 h. Actin cytoskeleton was stained with FITC-phalloidin (A12379, Life technologies), and nuclei were stained with 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride (DAPI; Sigma) for 45 min at room temperature. Coverslips were mounted in EUKITT[®] medium (O. Kindler). Images were taken using Zeiss LSM 800 with Airyscan confocal microscope.

Statistical analysis

Values are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses between several groups were performed using ANOVA followed by a post-test Bonferroni (Kruskal-Wallis if not parametric) with GraphPad Prism version 7 software (GraphPad Software, La Jolla, CA). A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant. **P* < 0.05; ***P* \leq 0.01; ****P* \leq 0.001.

Funding details: This work was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie, Inserm (UMR1071) and INRA (USC 2018), the Agence Nationale de la Recherche of the French government through the program "Investissements d'Avenir" (16-IDEX-0001 CAP 20-25) (to H.N.) and the European Union FP7 People Marie Curie International Incoming Fellowship (to H.N.).

Acknowledgments: We thank the platform CLIC (CLermont-ferrand Imagerie Confocale, Université Clermont Auvergne) for assistance with the confocal microscopy.

Disclosure of interest: The authors report no conflict of interest.

References

1. Palmela C, Chevarin C, Xu Z, Torres J, Sevrin G, Hirten R, Barnich N, Ng SC, Colombel J-F. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut* 2018; 67:574–87.
2. Carrière J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HTT. Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20:12102–17.
3. O'Brien CL, Bringer M-A, Holt KE, Gordon DM, Dubois AL, Barnich N, Darfeuille-Michaud A, Pavli P. Comparative genomics of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Gut* 2017; 66:1382–9.
4. Martinez-Medina M, Aldeguer X, Lopez-Siles M, González-Huix F, López-Oliu C, Dahbi G, Blanco JE, Blanco J, Garcia-Gil JL, Darfeuille-Michaud A. Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: New ecological evidence supporting the role of adherent-invasive E. coli (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15:872–82.
5. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser A-L, Barnich N, Bringer M-A, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel J-F. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 127:412–21.
6. Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, Englyst H, Williams HF, Rhodes JM. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 2004; 127:80–93.
7. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A, Colombel J-F. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998; 115:1405–13.

8. Nguyen HTT, Dalmaso G, Müller S, Carrière J, Seibold F, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease-associated adherent invasive *Escherichia coli* modulate levels of microRNAs in intestinal epithelial cells to reduce autophagy. *Gastroenterology* 2014; 146:508–19.
9. Bretin A, Carrière J, Dalmaso G, Bergougnoux A, B'chir W, Maurin AC, Müller S, Seibold F, Barnich N, Bruhat A, et al. Activation of the EIF2AK4-EIF2A/eIF2 α -ATF4 pathway triggers autophagy response to Crohn disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* infection. *Autophagy* 2016; 12:770–83.
10. Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, Perruchot MH, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun* 2001; 69:5529–37.
11. Vazeille E, Buisson A, Bringer MA, Goutte M, Ouchchane L, Hugot JP, de Vallée A, Barnich N, Bommelaer G, Darfeuille-Michaud A. Monocyte-derived macrophages from Crohn's disease patients are impaired in the ability to control intracellular adherent-invasive *Escherichia coli* and exhibit disordered cytokine secretion profile. *J Crohns Colitis* 2015; 9:410–20.
12. Bretin A, Lucas C, Larabi A, Dalmaso G, Billard E, Barnich N, Bonnet R, Nguyen HTT. AIEC infection triggers modification of gut microbiota composition in genetically predisposed mice, contributing to intestinal inflammation. *Sci Rep* 2018; 8:12301.
13. Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, Darcha C, Chan CHF, Stanners CP, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med* 2009; 206:2179–89.

14. Larabi A, Barnich N, Nguyen HTT. New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD. *Autophagy* 2019; 0:1–14.
15. Nguyen HTT, Lapaquette P, Bringer M-A, Darfeuille-Michaud A. Autophagy and Crohn's disease. *J Innate Immun* 2013; 5:434–43.
16. Lapaquette P, Bringer M-A, Darfeuille-Michaud A. Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell Microbiol* 2012; 14:791–807.
17. Brest P, Lapaquette P, Souidi M, Lebrigand K, Cesaro A, Vouret-Craviari V, Mari B, Barbry P, Mosnier J-F, Hébuterne X, et al. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet* 2011; 43:242–5.
18. Dalmaso G, Nguyen HTT, Faïs T, Massier S, Barnich N, Delmas J, Bonnet R. Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Manipulate Host Autophagy by Impairing SUMOylation. *Cells* 2019; 8:35.
19. Lapaquette P, Glasser A-L, Huett A, Xavier RJ, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol* 2010; 12:99–113.
20. Carrière J, Barnich N, Nguyen HTT. Exosomes: From Functions in Host-Pathogen Interactions and Immunity to Diagnostic and Therapeutic Opportunities. In: *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. page 39–75.
21. Carrière J, Bretin A, Darfeuille-Michaud A, Barnich N, Nguyen HTT. Exosomes Released from Cells Infected with Crohn's Disease-associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Activate Host Innate Immune Responses and Enhance Bacterial

- Intracellular Replication. *Inflamm Bowel Dis* 2016; 22:516–28.
22. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9:654–9.
 23. Singh PP, Li L, Schorey JS. Exosomal RNA from *Mycobacterium tuberculosis* - Infected Cells Is Functional in Recipient Macrophages. *Traffic* 2015; 16:555–71.
 24. Zhou C, Tan L, Sun Y, Qiu X, Liao Y, Song C, Liu W, Nair V, Ding C. Exosomes Carry microRNAs into Neighboring Cells to Promote Diffusive Infection of Newcastle Disease Virus. *Viruses* 2019; 11:527.
 25. Alexander M, Hu R, Runtsch MC, Kagele DA, Mosbrugger TL, Tolmachova T, Seabra MC, Round JL, Ward DM, O'Connell RM. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat Commun* 2015; 6.
 26. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan MLG, Karlsson JM, Baty CJ, Gibson GA, Erdos G, Wang Z, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 2012; 119:756–66.
 27. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Arozena AA, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016; 12:1–222.
 28. Zhang W, Jiang X, Bao J, Wang Y, Liu H, Tang L. Exosomes in Pathogen Infections: A Bridge to Deliver Molecules and Link Functions. *Front Immunol* 2018; 9:1–12.
 29. Abrami L, Brandi L, Moayeri M, Brown MJ, Krantz BA, Leppla SH, van der Goot FG. Hijacking Multivesicular Bodies Enables Long-Term and Exosome-Mediated Long-Distance Action of Anthrax Toxin. *Cell Rep* 2013; 5:986–96.
 30. Shimoda A, Ueda K, Nishiumi S, Murata-Kamiya N, Mukai S, Sawada S, Azuma T, Hatakeyama M, Akiyoshi K. Exosomes as nanocarriers for systemic delivery of the

- Helicobacter pylori* virulence factor CagA. Sci Rep 2016; 6:18346.
31. Chen Y, Wang X, Yu Y, Xiao Y, Huang J, Yao Z, Chen X, Zhou T, Li P, Xu C. Serum exosomes of chronic gastritis patients infected with *Helicobacter pylori* mediate IL-1 α expression via IL-6 trans-signalling in gastric epithelial cells. Clin Exp Immunol 2018; 194:339–49.
 32. Cheng Y, Schorey JS. Extracellular vesicles deliver *Mycobacterium* RNA to promote host immunity and bacterial killing. EMBO Rep 2019; 20:e46613.
 33. Walters SB, Kieckbusch J, Nagalingam G, Swain A, Latham SL, Grau GER, Britton WJ, Combes V, Saunders BM. Microparticles from *Mycobacteria*-Infected Macrophages Promote Inflammation and Cellular Migration. J Immunol 2013; 190:669–77.
 34. Hare NJ, Chan B, Chan E, Kaufman KL, Britton WJ, Saunders BM. Microparticles released from *Mycobacterium tuberculosis*-infected human macrophages contain increased levels of the type I interferon inducible proteins including ISG15. Proteomics 2015; 15:3020–9.
 35. Li L, Cheng Y, Emrich S, Schorey J. Activation of endothelial cells by extracellular vesicles derived from *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages or mice. PLoS One 2018; 13:e0198337.
 36. Fu Y, Zhang L, Zhang F, Tang T, Zhou Q, Feng C, Jin Y, Wu Z. Exosome-mediated miR-146a transfer suppresses type I interferon response and facilitates EV71 infection. PLOS Pathog 2017; 13:e1006611.
 37. Maemura T, Fukuyama S, Sugita Y, Lopes TJS, Nakao T, Noda T, Kawaoka Y. Lung-derived exosomal miR-483-3p regulates the innate immune response to Influenza virus infection. J Infect Dis 2018; 217:1372–82.
 38. Jiang K, Yang J, Guo S, Zhao G, Wu H, Deng G. Peripheral Circulating Exosome-

- Mediated Delivery of miR-155 as a Novel Mechanism for Acute Lung Inflammation. *Mol Ther* 2019; 27:1–14.
39. Wang J, Deng Z, Wang Z, Wu J, Gu T, Jiang Y, Li G. MicroRNA-155 in exosomes secreted from *Helicobacter pylori* infection macrophages immunomodulates inflammatory response. *Am J Transl Res* 2016; 8:3700–9.
 40. Alipour SD, Mortaz E, Tabarsi P, Farnia P, Mirsaeidi M, Garssen J, Movassaghi M, Adcock IM. Bovis Bacillus Calmette–Guerin (BCG) infection induces exosomal miRNA release by human macrophages. *J Transl Med* 2017; 15:105.
 41. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GSA, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, Crabtree J, Sebahia M, Thomson NR, Chaudhuri R, et al. The Pangenome Structure of *Escherichia coli*: Comparative Genomic Analysis of *E. coli* Commensal and Pathogenic Isolates. *J Bacteriol* [Internet] 2008; 190:6881–93.

Legends of figures

Figure 1. AIEC LF82-infected IECs release exosomes that can inhibit autophagy in recipient cells.

Exosomes were purified from the culture supernatant of uninfected T84 cells (Exo-uninfected) or T84 cells infected with the AIEC LF82 (Exo-LF82), the *E. coli* K12 MG1655 strain (Exo-K12) or the commensal *E. coli* HS strain (Exo-HS) for 12 h. **(A)** Western blot analysis of the exosomal markers CD63 and CD9, and the negative marker GRP94 using 30 μ g of exosomal protein lysate or T84 protein lysate. **(B-E)**. T84 cells were stimulated for 8 h with Exo-uninfected, Exo-LF82, Exo-K12 or Exo-HS (80 of μ g exosome/mL of culture medium) and then uninfected **(B, C)** or infected with LF82 for 4 h **(D, E)**. Representative western blot analysis **(B, D)** and quantification of LC3-II/ β -actin band intensity **(C, E)** are shown. Data are representative of three independent experiments and are presented as means \pm SEM. Statistical analysis was performed using the one-way Anova test followed by a Bonferroni post-test. * $P < 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Figure 2. MiR-30c and miR-130a levels are increased in the exosomes released from AIEC LF82-infected IECs and in exosome-receiving IECs.

(A, B) Exosomes were purified from uninfected T84 cells (Exo-uninfected) or T84 cells infected with the AIEC LF82 (Exo-LF82), the *E. coli* K12 MG1655 strain (Exo-K12) or the *E. coli* HS strain (Exo-HS) for 12 h. The levels of miR-30c and miR-130a in exosome-donor cells **(A)** and in the purified exosomes **(B)** were analyzed by qRT-PCR. **(C)** T84 cells were stimulated with the purified exosomes (80 μ g of exosome/mL of culture medium), and the levels of miR-30c and miR-130a in these cells were analyzed by qRT-PCR. Data are representative of three independent experiments and are presented as means \pm SEM.

Statistical analysis was performed using the one-way Anova test followed by a Bonferroni post-test. * $P < 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Figure 3. MiR-30c and miR-130a are efficiently transferred *via* exosomes from donor cells to recipient cells.

T84 cells were transfected with 50 nM of Alexa Fluor 555-labeled-miR-30c (A) or Alexa Fluor 555-labeled-miR-130a (B) for 24 h, and uninfected or infected with the AIEC LF82, the *E. coli* K12 or the *E. coli* HS strain with a MOI of 10 for 12 h. Exosomes released from these cells were extracted and designated as Exo-uninfected, Exo-LF82, Exo-K12 and Exo-HS. Naïve T84 cells were incubated with the purified exosome (80 µg of exosome/mL of culture medium) for 8 h. Confocal microscopic analysis of T84 cells that received exosomes from cells transfected with miR-30c (A) or miR-130a (B) labeled with Alexa Fluor 555 (red). Actin cytoskeleton was stained with FITC-phalloidin (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bars = 5 µm.

Figure 4. MiR-30c and miR-130a transferred from exosomes target and inhibit ATG5 and ATG16L1 expression.

Exosomes were purified from uninfected T84 cells (Exo-uninfected) or T84 cells infected with the AIEC LF82 (Exo-LF82), the *E. coli* K12 MG1655 (Exo-K12) or the HS strain (Exo-HS) for 12 h. (A) T84 cells were transfected with *ATG5*-3'-UTR-luc or *ATG16L1*-3'-UTR-luc construct, in which the 3'-UTR of *ATG5* or *ATG16L1* mRNA was cloned downstream a luciferase-coding sequence in the pMIR-REPORT luciferase vector, or with the empty vector. Sixteen hours after transfection, the cells were incubated with Exo-uninfected, Exo-K12, Exo-HS or Exo-LF82 (80 µg of exosome/mL of culture medium) for 8 h. Luciferase activity was measured and normalized to protein concentration of cell lysate. (B-D) T84 cells were

stimulated with exosomes as in **A** for 8 h, and ATG5 and ATG16L1 expression at mRNA and protein levels were analyzed by qRT-PCR (**B**) and western blot (**C**) respectively. (**D**) Quantification of band intensity in **C**. Data are representative of three independent experiments and are presented as means \pm SEM. Statistical analysis was performed using the one-way Anova test followed by a Bonferroni post-test. * $P < 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Figure 5. Inhibition of miR-30c and miR-130a in AIEC-infected T84 cells abolishes the increase in miR-30c and miR-130a levels in exosomes and in exosome-receiving cells.

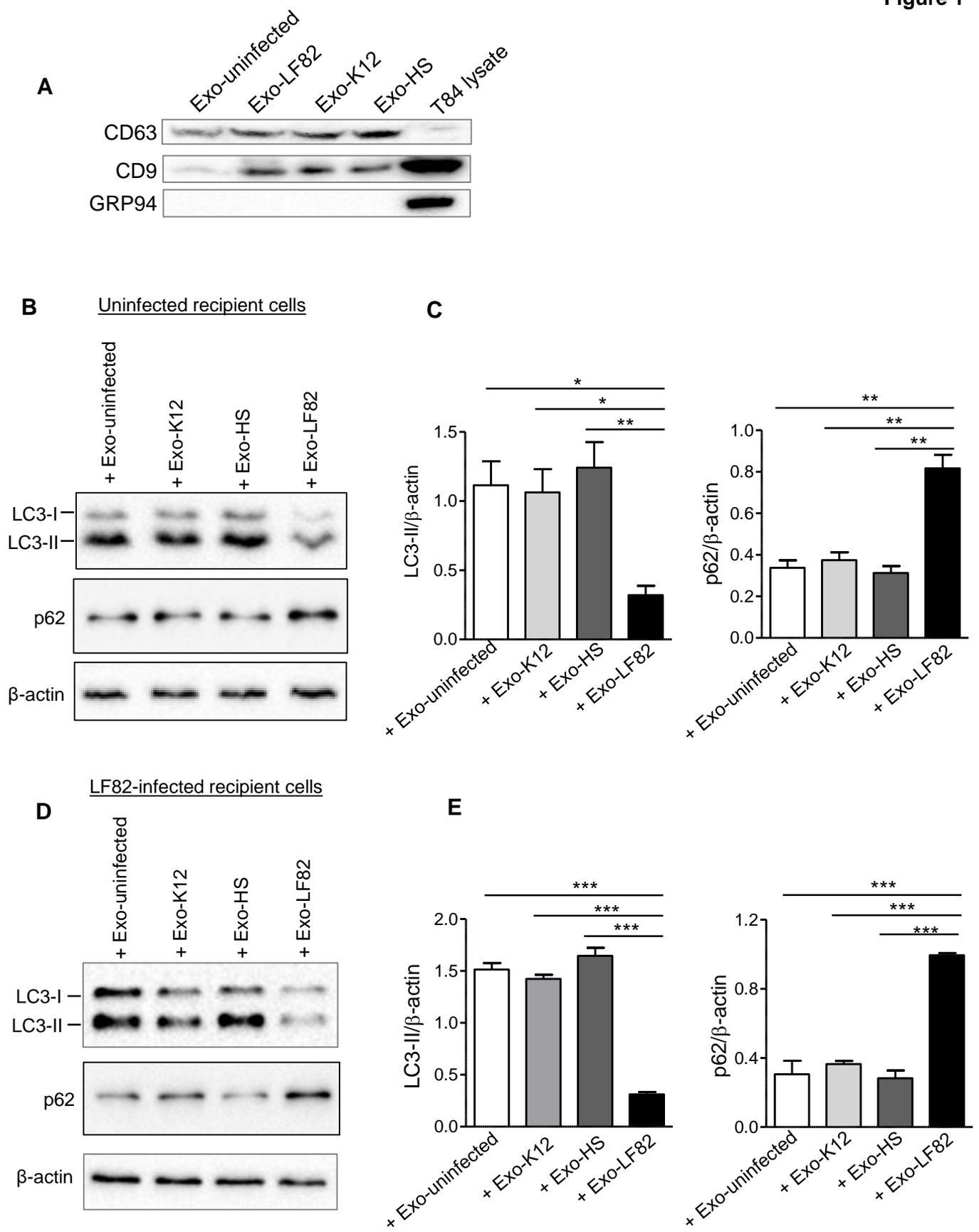
(**A**) T84 cells were transfected with vehicle or with 50 nM of anti-miR-negative control (anti-miR-NC) or with a combination of anti-miR-30c and anti-miR-130a. One day post-transfection, the cells were uninfected or infected with the AIEC LF82 or the commensal *E. coli* HS strain for 12 h. The levels of miR-30c and miR-130a were analyzed by qRT-PCR. (**B**) Naïve T84 cells were transfected with the *ATG5*-3'-UTR-luc or *ATG16L1*-3'-UTR-luc construct, in which the 3'-UTR of *ATG5* or *ATG16L1* mRNA was cloned downstream a luciferase-coding sequence in the pMIR-REPORT luciferase vector. Sixteen hours after transfection, the cells were stimulated with the exosomes purified from the culture supernatant of the cells in **A** (designated as Exo-uninfected, Exo-LF82 and Exo-HS) for 8 h (80 μ g of exosome/mL of culture medium). Luciferase activity was measured at 1 day post-transfection and was normalized to protein concentration of cell lysate. (**C**) Naïve T84 cells were stimulated with the purified exosomes as in **B** for 8 h, and miR-30c and miR-130a levels in the exosome-receiving cells were analyzed by qRT-PCR. Data are representative of three independent experiments and are presented as means \pm SEM. Statistical analysis was performed using the one-way Anova test followed by a Bonferroni post-test. * $P < 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

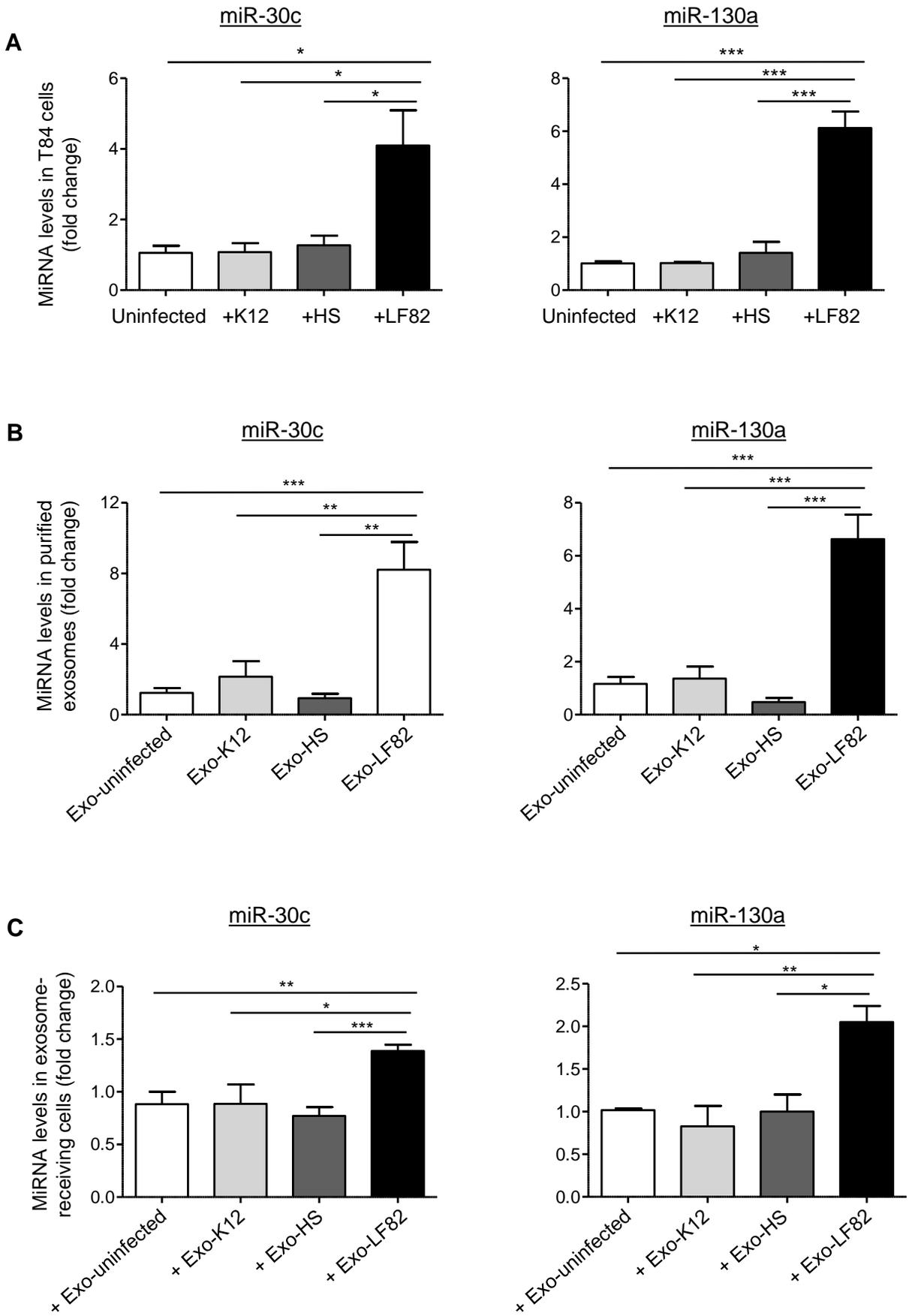
Figure 6. Inhibition of miR-30c and miR-130a in AIEC-infected T84 cells abolishes the inhibitory effect of exosomes on autophagy-mediated AIEC clearance in recipient cells.

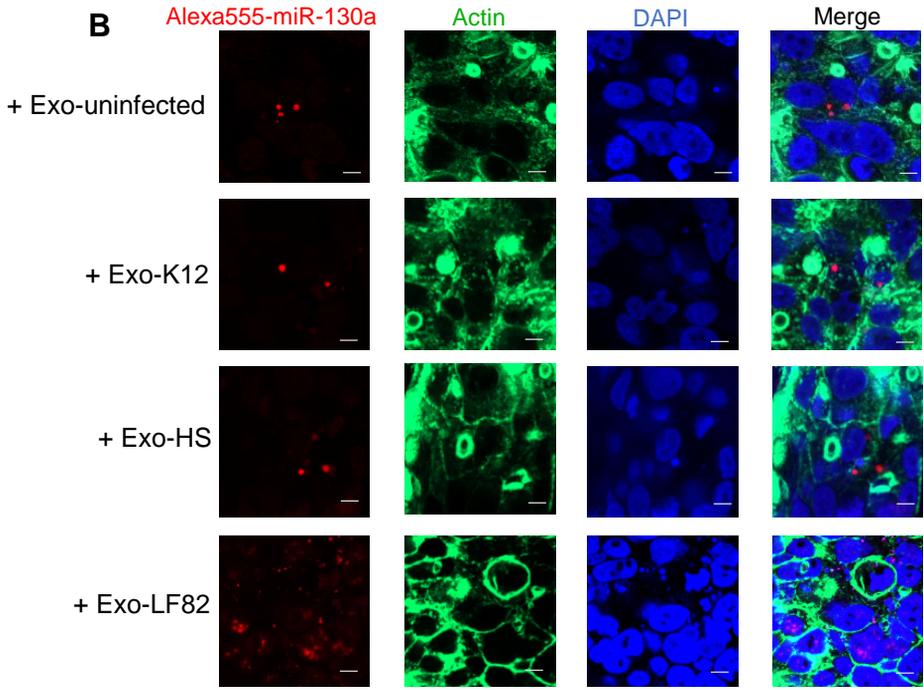
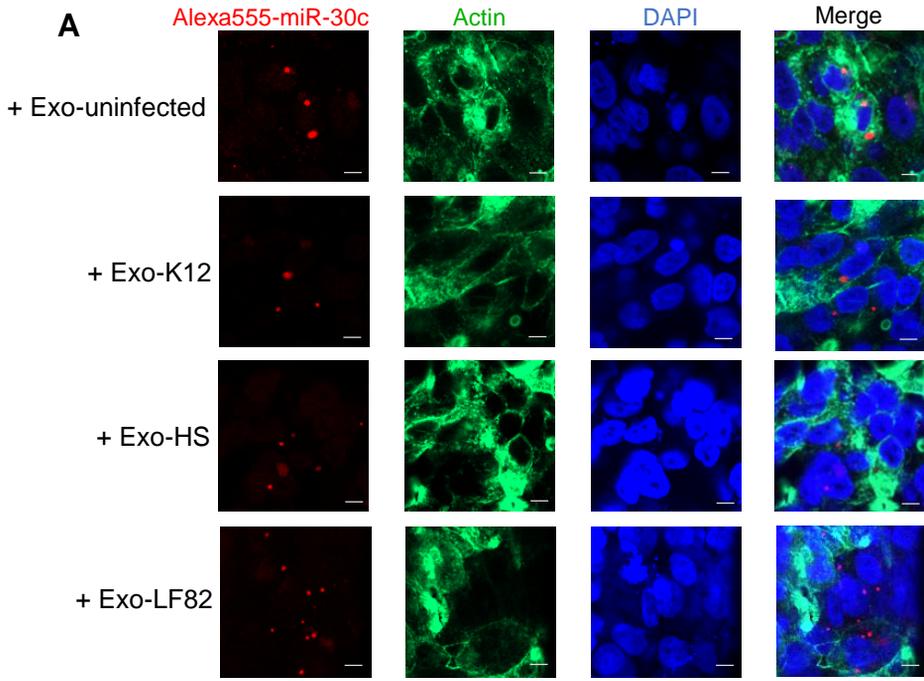
T84 cells were transfected with vehicle or with 50 nM of anti-miR-negative control (anti-miR-NC) or a combination of anti-miR-30c and anti-miR-130a. One day post-transfection, the cells were uninfected or infected with the AIEC LF82 or the commensal *E. coli* HS strain for 12 h, and exosomes were purified from the culture supernatant (designated as Exo-uninfected, Exo-LF82 and Exo-HS). Naïve T84 cells were stimulated with the purified exosomes for 8 h (80 µg exosome/mL of culture medium). (A) *ATG5* and *ATG16L1* mRNA expression levels in exosome-receiving cells were analyzed by qRT-PCR. Western blot analysis of *ATG5*, *ATG16L1* and LC3 expression (B) and band intensity quantification (C). (D) Exosome-receiving cells were infected with the AIEC LF82 strain, and the number of intracellular LF82 bacteria was determined using gentamicin-protection assay. The results are presented as percentage of CFU of LF82 determined at 24 h *versus* 4 h post-infection, defined as 100%. Data are representative of three independent experiments and are presented as means ± SEM. Statistical analysis was performed using the one-way Anova test followed by a Bonferroni post-test. * $P < 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

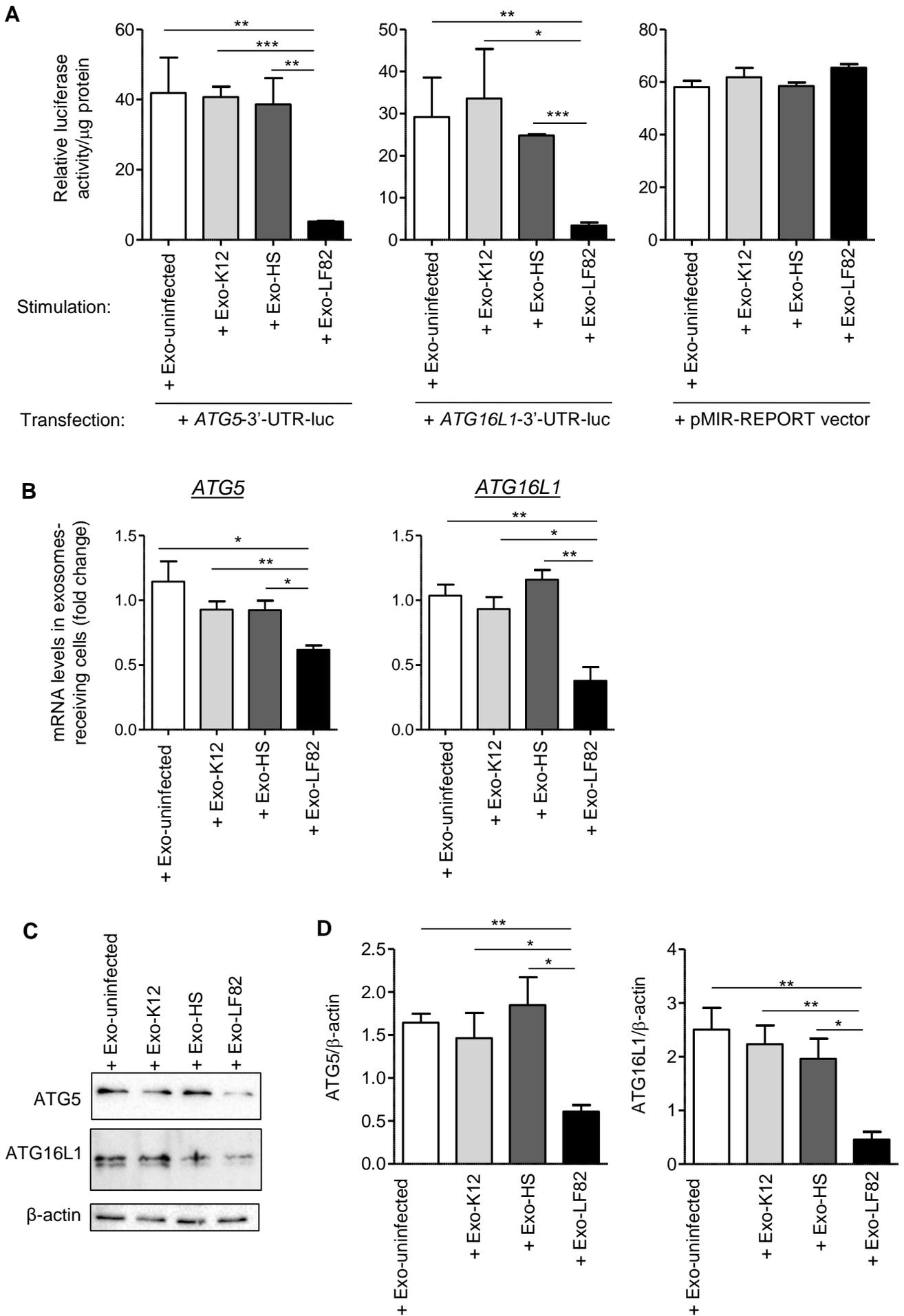
Figure 7. Model for the role of exosomes in transferring miR-30c and miR-130a from cell-to-cell to inhibit autophagy during infection with CD-associated AIEC.

AIEC upregulate miR-30c and miR-130a in host cells to inhibit autophagy and this can be amplified from cells to cells *via* the exosomal shuttle, which transfer these miRNAs to adjacent cells. This consequently leads to impaired autophagy-mediated AIEC clearance, favoring AIEC colonization.

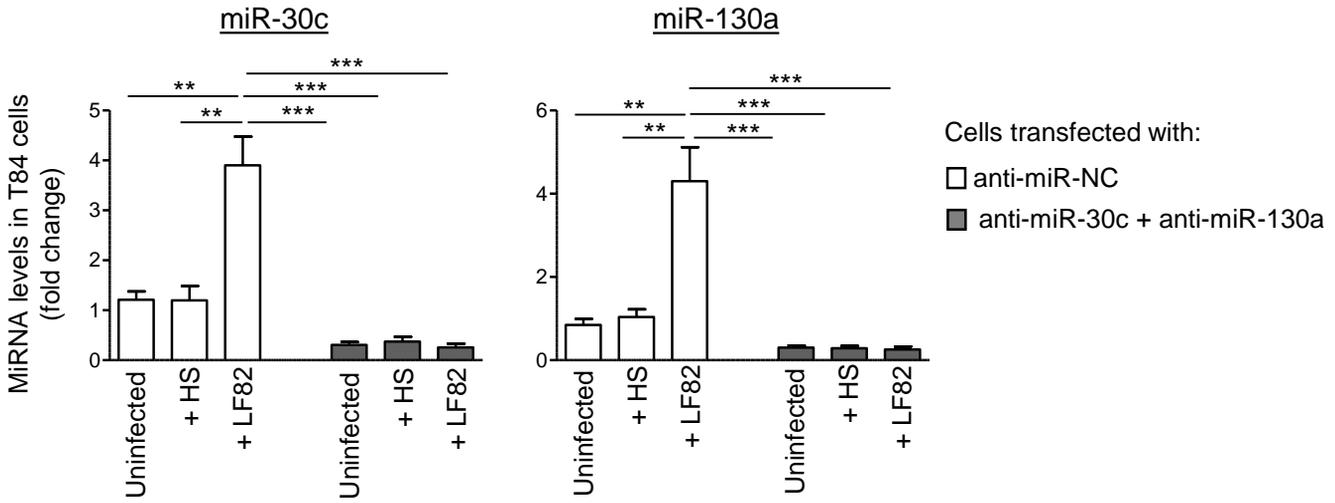




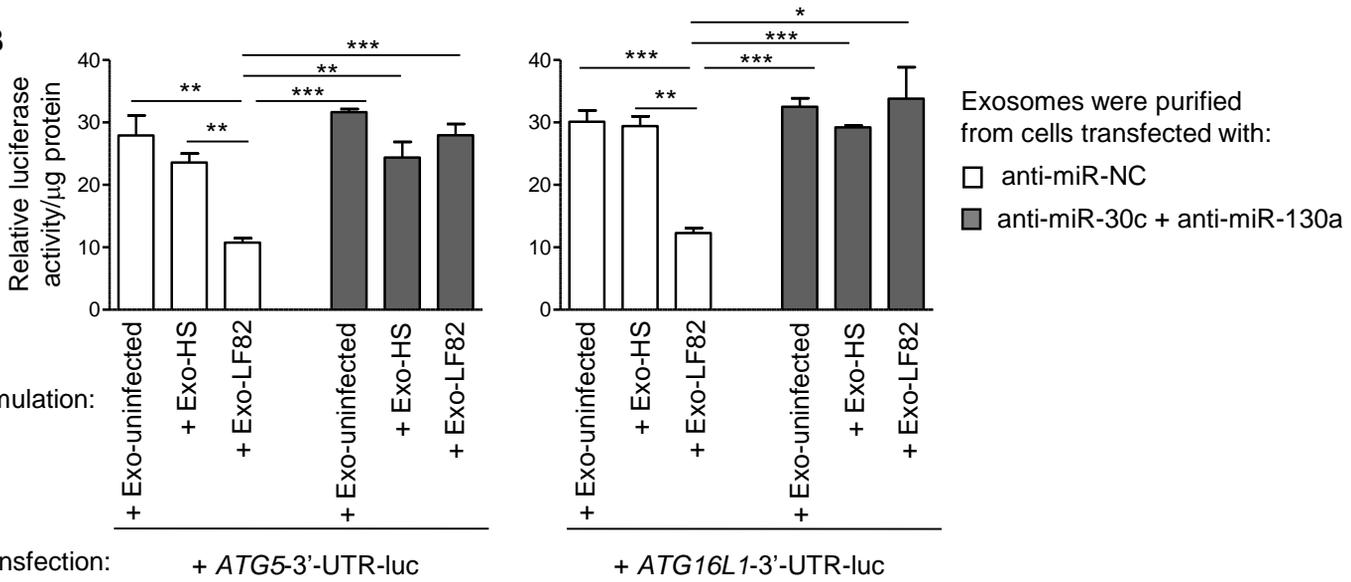




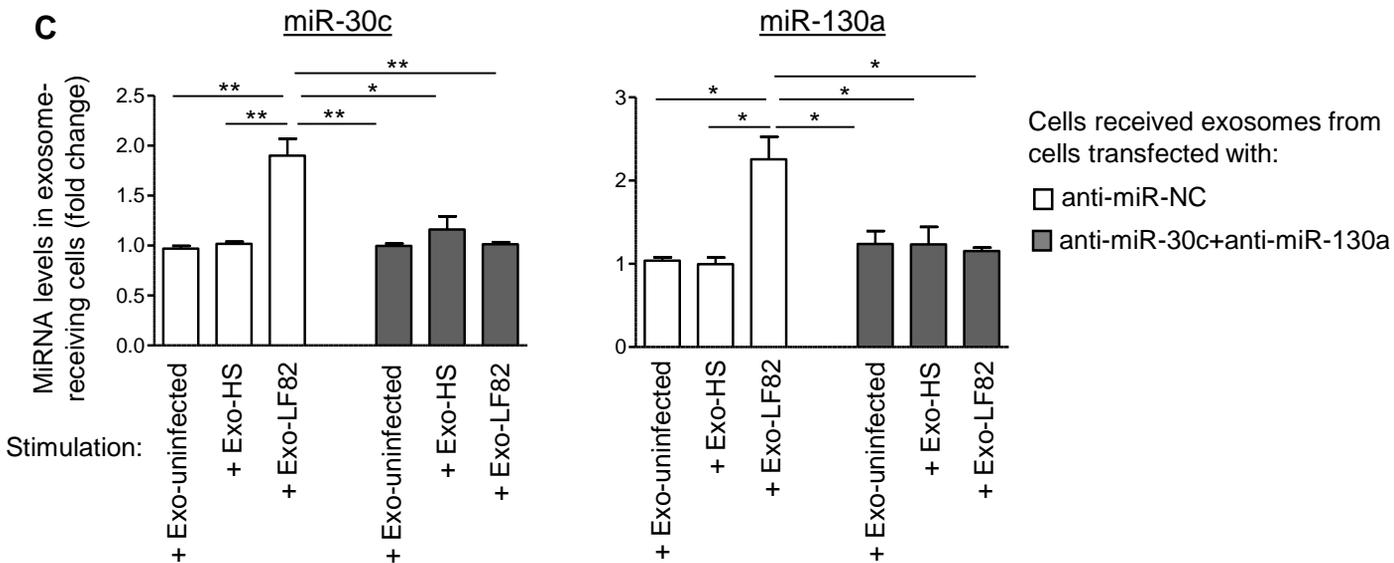
A

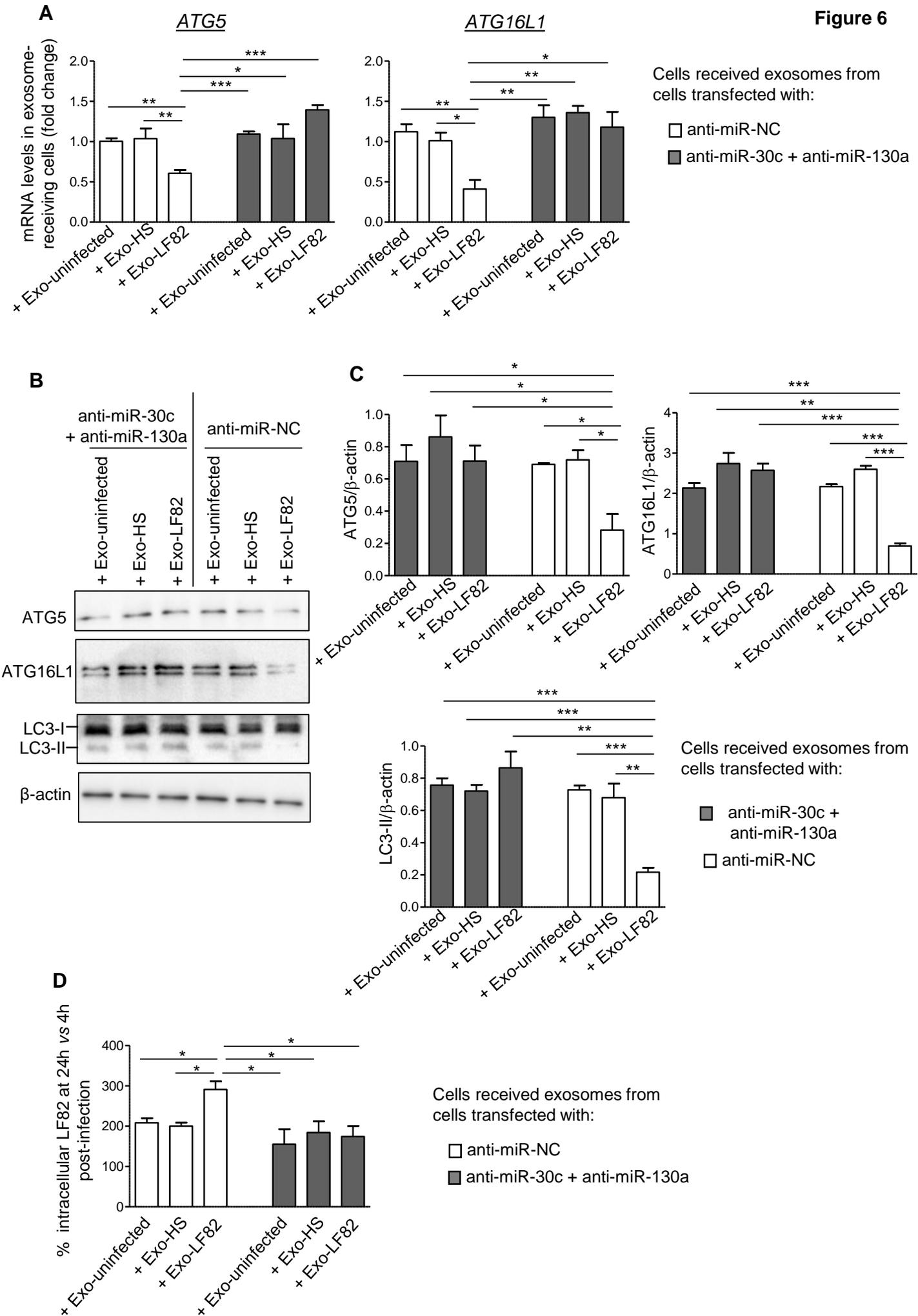


B



C





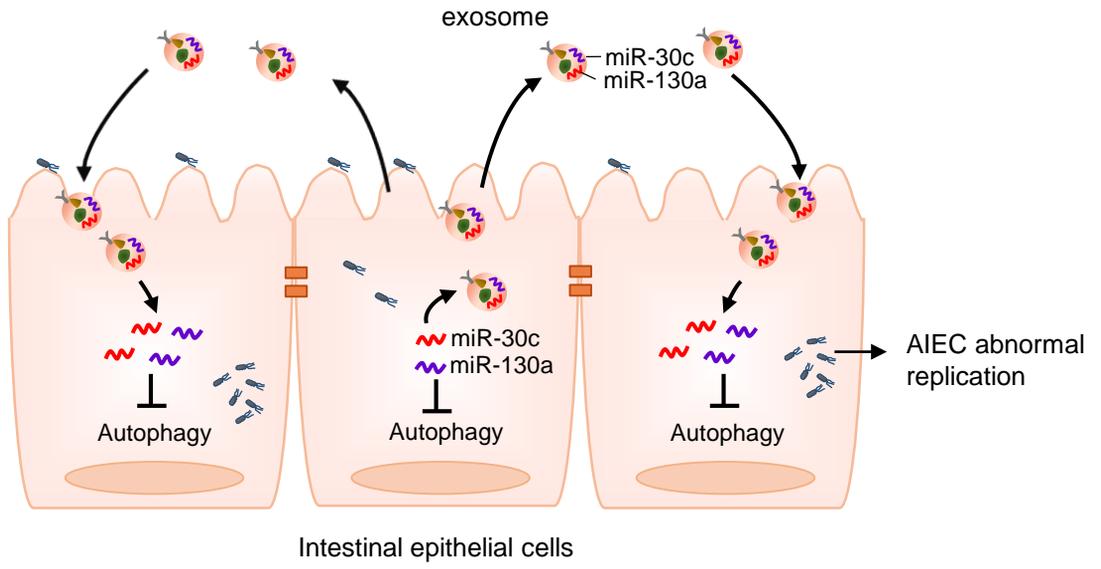


Table S1: Primers for qRT-PCR.

Primer	Sequence (5'-3')
<i>U6</i> -Forward	CGCAAGGATGACACGCAAATTCGT
miR-30c-Forward	TGTAAACATCCTACACTCTCAGC
miR-130a-Forward	CAGTGCAATGTTAAAAGGGCAT
<i>18S</i> -Forward	CCCCTCGATGCTCTTAGCTGAGTGT
<i>18S</i> -Reverse	CGCCGGTCCAAGAATTTACCTCT
<i>ATG5</i> -Forward	TACCGGACCACTGAAGGTCT
<i>ATG5</i> -Reverse	TCGAGTGGCACATACTTCCA
<i>ATG16LI</i> -Forward	CCCCACATCAAGGTGGTGTT
<i>ATG16LI</i> -Reverse	GAACCCAAGGTGTTGGGACA

II.2 Identification du ou des récepteur(s) autophagique(s) mis en jeu dans la reconnaissance des bactéries AIEC par l'autophagie

Les récepteurs de l'autophagie jouent un rôle essentiel en aidant les autophagosomes à cibler spécifiquement les micro-organismes marqués à l'ubiquitine et, à ce jour, plusieurs récepteurs de l'autophagie impliqués dans l'élimination des micro-organismes ont été identifiés, notamment NBR1 (Franco *et al.*, 2017), TAX1BP1 (Tumbarello *et al.*, 2015), NDP52 (Thurston *et al.*, 2009), p62 (Zheng *et al.*, 2009), et optineurine (OPTN) (Wild *et al.*, 2011). Les récepteurs de l'autophagie interagissent à la fois avec la bactérie ubiquitinylée dans le cytoplasme et avec LC3/GABARAP porté par le phagophore, emprisonnant ainsi leur cible de manière spécifique (Birgisdottir *et al.*, 2013). De plus, les adaptateurs de l'autophagie, tels que NDP52 et TAX1BP1, interagissent aussi avec la myosine VI et régulent ainsi la maturation de l'autophagosome et la formation de l'autolysosome au cours d'une infection par *Salmonella* (Tumbarello *et al.*, 2012; Verlhac *et al.*, 2015).

Nous avons tout d'abord évalué le rôle de trois récepteurs de l'autophagie dirigée contre les bactéries, NDP52, p62 et optineurine dans la reconnaissance et l'élimination des AIEC par la machinerie autophagique, en utilisant 2 approches expérimentales : l'invalidation de l'expression du récepteur et la colocalisation du récepteur avec la bactérie.

- **Analyse de l'impact d'une déficience de chaque récepteur potentiel sur le contrôle de la multiplication intracellulaire des AIEC**

Les cellules épithéliales intestinales humaines T84 ont été transfectées avec un siARN contrôle ou un siARN dirigé contre *NDP52*, *p62* ou *OPTN* puis infectées avec la souche AIEC LF82. L'analyse par western blot montre que les siARN-*NDP52*, siARN-*P62* et siARN-*OPTN* diminuent l'expression de NDP52, p62 et OPTN respectivement.

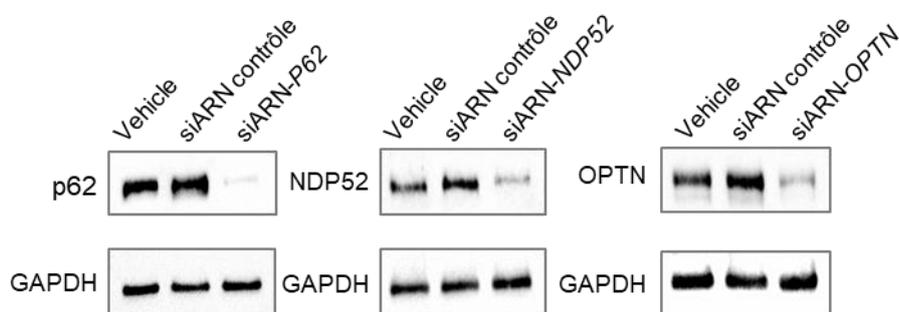


Figure 1 : L'expression des récepteurs de l'autophagie est diminuée dans les cellules T84 suite à la transfection des siARN correspondants. Les cellules T84 ont été transfectées avec un mélange de siARN (Dharmacon, GE healthcare) dirigés contre *P62*, *NDP52* ou *OPTN*, ou avec un siARN contrôle à une concentration finale de 100 nM en utilisant de la Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific). L'efficacité de transfection a été analysée à 48 h post-transfection par western blot.

Les résultats préliminaires montrent que la multiplication intracellulaire de la souche AIEC LF82, déterminée par un test de protection à la gentamicine, est augmentée dans les cellules transfectées avec les siARN dirigés contre *NDP52* ou *P62* par rapport aux cellules transfectées avec le siARN contrôle.

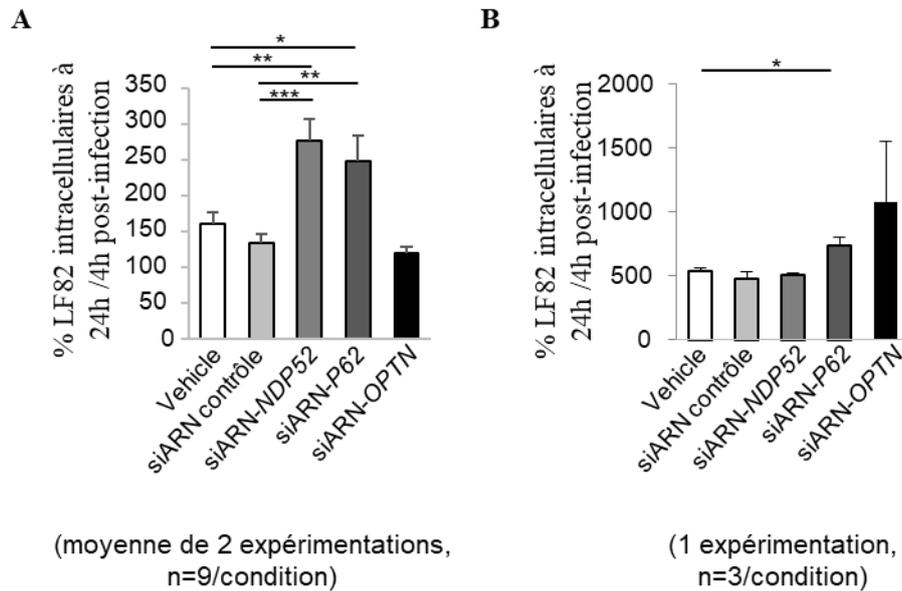


Figure 2 : La diminution de l'expression des récepteurs NDP52 ou OPTN augmente la réplication intracellulaire des AIEC en cellules T84. (A et B) Les cellules T84 ont été transfectées avec 100 nM de siARN contrôle ou de siARN dirigé contre *NDP52*, *P62* ou *OPTN*, puis infectées 48 h après transfection avec la souche AIEC LF82 à une multiplicité d'infection (MOI) de 10 bactéries par cellule pendant 3 h. Le nombre de bactéries à 4 h et 24 h a été déterminé par un test de protection à la gentamicine. (A) Graphique représentatif des résultats obtenus pour deux expérimentations (n=9). (B) Graphique représentatif des résultats obtenus pour une expérimentation (n=3). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant un test paramétrique non paillé. *P < 0.05; **P ≤ 0.01; ***P ≤ 0.001.

Cependant, la grande variabilité des résultats obtenus au cours des différentes expériences ne nous permet pas de conclure quant au(x) récepteur(s) impliqué(s), un phénomène probablement dû à la variabilité de l'efficacité de transfection. Ainsi, nous devons effectuer ces mêmes analyses dans des cellules Hela rendues déficientes pour *NDP52*, *p62* et *OPTN* par le système CRISPR-Cas9. Ces cellules nous seront fournies par le Dr Richard Youle (Biochemistry Section, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA).

Les cellules T84 transfectées avec les siARN dirigés contre les récepteurs de l'autophagie ont par ailleurs été observées en microscopie électronique à transmission. Les résultats obtenus montrent que les bactéries AIEC sont bien retrouvées au sein de vésicules autophagiques, mais cette expérience sera à nouveau réalisée en infectant les cellules avec un nombre de bactéries plus

important. Nous espérons ainsi pouvoir observer une diminution du nombre de bactéries intracellulaires ciblées par l'autophagie dans les cellules déficientes pour l'un des récepteurs.

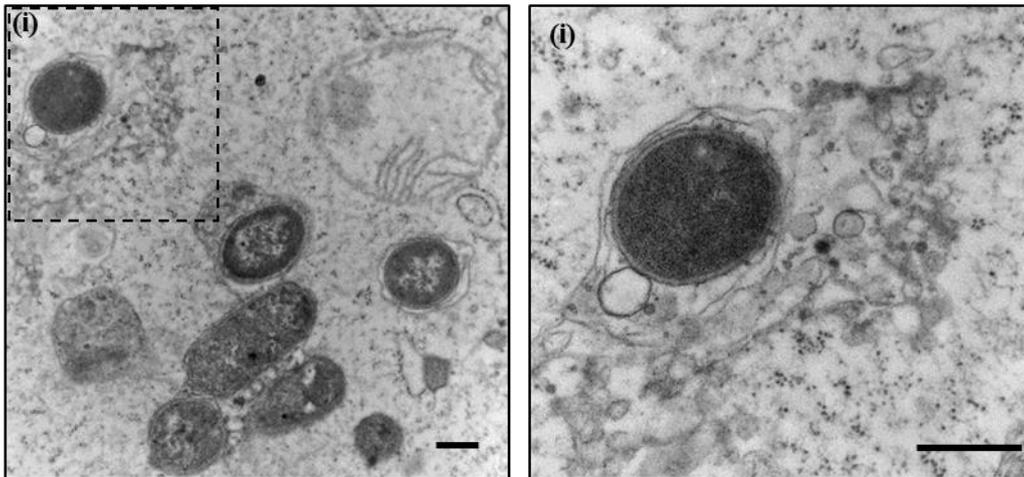


Figure 3 : Les AIEC sont retrouvées dans des compartiments multi-membranaires en cellules épithéliales intestinales T84. Les cellules T84 ont été transfectées avec 100nM de siARN dirigé contre p62 et infectées 48h après transfection avec la souche AIEC LF82 à une MOI de 10 pendant 15 h. Les cellules ont été observées en microscopie électronique à transmission. (i) Grossissement de la zone en pointillés. Barre = 500 nm.

- **Mise en évidence de la colocalisation entre les bactéries AIEC, la protéine LC3 et le récepteur autophagique.**

Afin de démontrer que NDP52, p62 ou OPTN sert de récepteur autophagique pour les bactéries AIEC, il est nécessaire de montrer la colocalisation du récepteur avec la bactérie et la protéine LC3 par microscopie confocale. Pour cela, les cellules épithéliales intestinales seront infectées avec la souche LF82-GFP et un marquage par immunofluorescence sera réalisé afin de détecter la protéine LC3 et le récepteur autophagique. Le résultat préliminaire montre une colocalisation entre la bactérie LF82, p62 et LC3 dans les cellules HeLa.

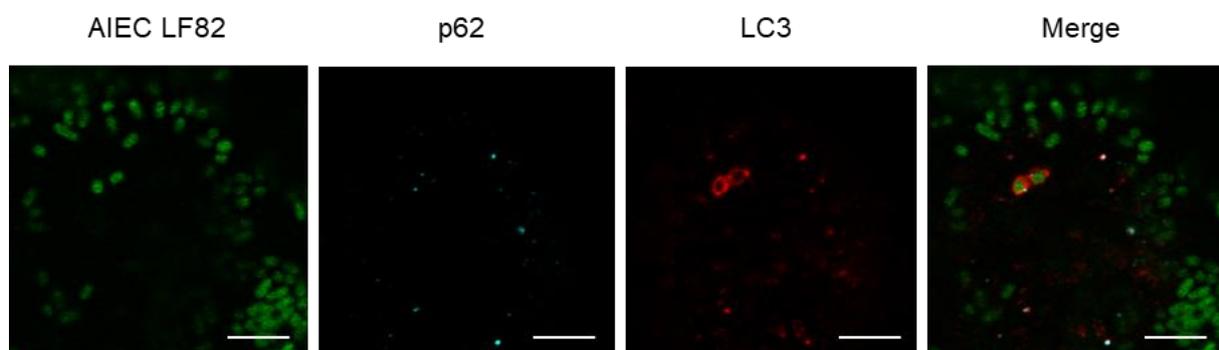


Figure 4 : La bactérie AIEC LF82 colocalise avec le récepteur p62 et la protéine LC3 en cellules épithéliales HeLa. Les cellules HeLa ont été infectées pendant 6 h avec la souche AIEC LF82 exprimant la protéine GFP à une MOI de 100. Un marquage immunofluorescent pour détecter p62 (bleu) et LC3 (rouge) a été réalisé. L'observation a été réalisée sur un microscope confocal Zeiss LSM 800 Airyscan. Barre : 5 μm.

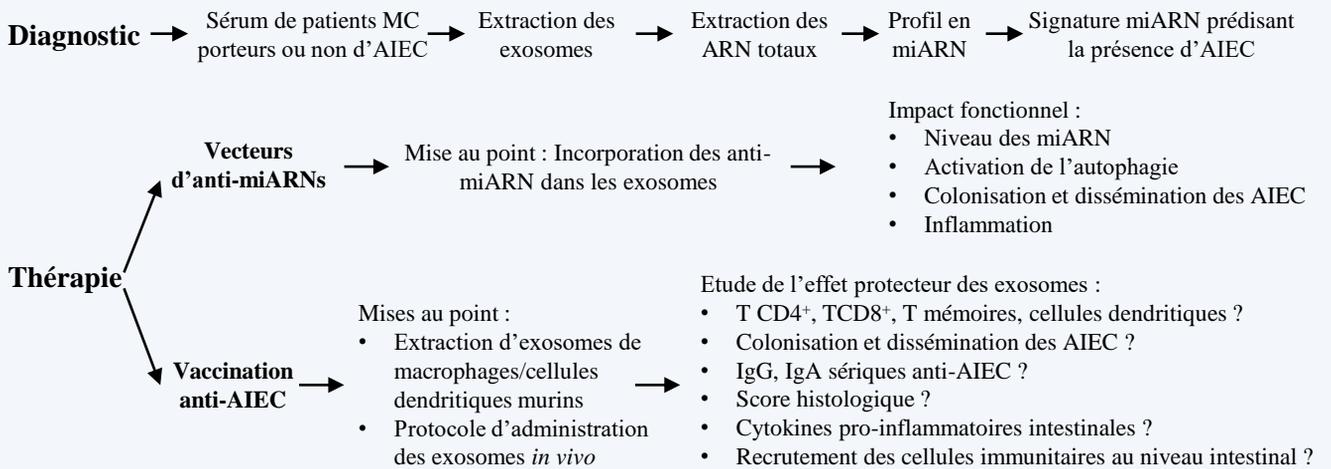
Cependant, les observations en microscopie confocale pour les autres récepteurs de l'autophagie restent à réaliser. Les mêmes expériences seront réalisées en utilisant les cellules transfectées avec un siARN dirigé contre le récepteur autophagique ou les cellules Hela/Crispr-Cas9 déficientes en NDP52, p62 ou optineurine.

Par ailleurs, l'interaction physique entre les bactéries AIEC et les récepteurs autophagiques sera analysée par co-immunoprécipitation.

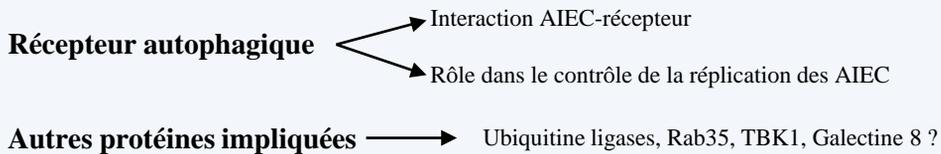
1) Impact des exosomes et OMV bactériens sur les cellules réceptrices : mécanismes moléculaires



2) Potentiel diagnostique et thérapeutique des exosomes



3) Mécanisme de reconnaissance des AIEC par l'autophagie



Impact des variants de risque associés à la MC sur la réplication des AIEC

Figure 44 : Plan récapitulatif des perspectives du projet de thèse.

III. Discussion et perspectives

L'ensemble des perspectives discutées au cours de ce chapitre sont représentées dans la **Figure 44**.

III.1 Identification du mécanisme moléculaire par lequel les exosomes exercent leurs effets au sein des cellules réceptrices

III.1.1 Objectif 1 : Etude du rôle des miARN exosomaux

Les résultats de notre étude ayant révélé la capacité des miARN exosomaux à inhiber l'autophagie dans les cellules réceptrices durant l'infection par des bactéries AIEC, il apparaît intéressant d'étudier la composition globale en miARN de ces exosomes et les fonctions des miARN exosomaux dans les cellules réceptrices.

III.1.1.1 Analyse du profil global en miARN dans les exosomes sécrétés par les cellules épithéliales intestinales infectées par les AIEC.

Le profil global en miARN des exosomes pourrait être déterminé par une puce miARN. Les exosomes sécrétés par les cellules T84 non infectées (Exo-NI) ou infectées avec la souche AIEC LF82 (Exo-LF82), la souche *E. coli* non pathogène K12 MG1655 (Exo-K12) ou la souche *E. coli* commensale HS (Exo-HS) ont été isolés puis leur contenu en ARN totaux a été purifié. Cependant, l'analyse de miARN par puce nécessite l'obtention d'une suspension d'ARN totaux de concentration supérieure à 50 ng/ μ l et de qualité satisfaisante. Plusieurs méthodes d'extraction des exosomes et des ARN totaux d'exosomes ont été appliquées, sans qu'aucune d'entre elles ne nous permette de satisfaire à ces exigences.

Afin d'obtenir une quantité de matériel suffisante, nous utiliserons un kit (System Biosciences) permettant la purification des exosomes, l'extraction d'ARN totaux à partir des exosomes, la synthèse des ADNc et l'amplification par PCR des brins « sens » de ces ADNc, qui seront ensuite analysés par une puce miARN.

III.1.1.2 Analyse du rôle des miARN exosomaux dans les cellules réceptrices

Les niveaux des miARN dérégulés dans les Exo-LF82 par rapport aux Exo-NI, Exo-K12 ou Exo-HS seront analysés dans les cellules recevant ces exosomes par RT-PCR quantitative (RT-PCRq). Les gènes cibles de ces miARNs et les processus biologiques potentiellement modifiés par les miARN exosomaux seront déterminés par une analyse *in silico*. L'expression de gènes cibles des miARN exosomaux dans les cellules réceptrices suite à une stimulation avec des exosomes sera analysée. L'impact des miARN exosomaux et de leurs gènes cibles sur les différents processus biologiques au cours de l'infection par les bactéries AIEC sera étudié en utilisant des approches

similaires à celles utilisées dans le manuscrit soumis dans le journal Gut Microbes : Larabi A., Dalmaso G., Delmas J., Barnich N., Nguyen H.T.T., Exosomes transfer miRNAs from cell-to-cell to inhibit autophagy during infection with Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli*.

III.1.1.3 Etude du rôle des miARN exosomaux dans la modulation de l'inflammation dans les macrophages humains

Le laboratoire a récemment montré que les exosomes sécrétés par les macrophages humains THP-1 infectés par la souche AIEC LF82 sont capables d'induire une augmentation de l'inflammation dans les macrophages receveurs (Carrière *et al.*, 2016b). Nous allons étudier si les miARN exosomaux sont impliqués dans ce processus.

- **Analyse du contenu en miARN des exosomes sécrétés par les macrophages THP-1**

Le niveau de différents miARN rapportés comme dérégulés dans le sérum et le sang périphérique de patients atteints de MC a été analysé par RT-PCRq dans les exosomes sécrétés par les macrophages humains THP-1. Parmi les miARN dérégulés dans les Exo-LF82 par rapport aux Exo-NI, Exo-K12 et Exo-HS, une augmentation du niveau des miR-21 et miR-29a a été détectée. De même, une tendance à l'augmentation de ces deux miARN a pu être observée dans les macrophages receveurs de ces exosomes, suggérant leur transfert des exosomes aux cellules réceptrices.

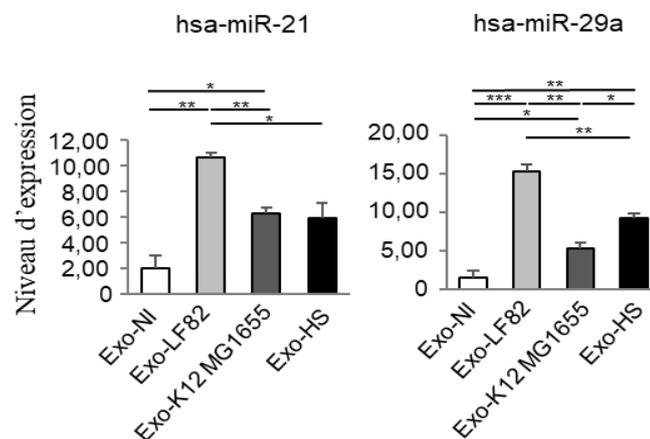


Figure 5 : Les niveaux des miR-21 et miR-29a augmentent dans les exosomes sécrétés par les macrophages THP-1 suite à l'infection par les AIEC. Les macrophages THP-1 ont été non infectés ou infectés avec la souche AIEC LF82, la souche *E. coli* K12 MG1655, ou la souche *E. coli* commensale HS à une MOI de 10 pendant 8h. Les exosomes ont été purifiés à partir du surnageant de culture à l'aide de la solution ExoQuick-TC™. Les ARN totaux des exosomes ou des macrophages THP-1 stimulés ont été isolés à l'aide du kit miRNeasy (Qiagen). Pour les échantillons exosomaux, afin de permettre la normalisation des résultats suite à la RT-PCRq, 5 µL d'un mélange contenant 25 fmol de 3 miARN synthétiques de *Caenorhabditis elegans*, cel-miR-39-3p, cel-miR-54-3p et cel-miR-238-3p (mirVana™ miRNA mimic, Life Technologies) ont été ajoutés. Les miARN ont été reverse transcrits en ADNc à l'aide du kit NCode (Agilent).

- **Analyse de l'impact des miARN exosomaux 21 et 29a sur l'inflammation**

Il a été rapporté que les miR-21 et miR-29a contenus dans des exosomes dérivés de tumeurs sont transférés aux cellules immunitaires réceptrices et induisent une inflammation en agissant comme ligands des récepteurs humains TLR8 (Fabbri *et al.*, 2012). Afin d'examiner l'impact de ces miARN sur l'inflammation durant l'infection par les bactéries AIEC, les macrophages THP-1 donneurs d'exosomes seront transfectés avec des anti-sens des miR-21 et miR-29a et les niveaux de cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les macrophages receveurs suite à la stimulation par les exosomes seront analysés par ELISA.

Pour étudier l'implication du récepteur TLR8, les macrophages THP-1 seront transfectés avec un siARN contrôle ou un siARN dirigé contre *TLR8* avant d'être stimulés avec les exosomes. L'activation de la voie NF- κ B en aval du récepteur TLR8 sera analysée par western blot et la sécrétion de TNF- α et d'IL-6 induite par cette voie sera analysée par ELISA.

L'interaction entre le miR-21 ou le miR-29a et le récepteur TLR8 sera étudiée par co-immunoprécipitation en utilisant un anticorps dirigé contre TLR8 et par RT-PCRq pour détecter ces miARN. La colocalisation entre ces miARN et le récepteur TLR8 sera confirmée en transfectant les macrophages donneurs d'exosomes avec les miARN couplés à des fluorochromes. Les exosomes seront isolés et incubés avec les macrophages receveurs, qui seront alors observés en microscopie confocale après un marquage du récepteur TLR8.

III.1.2 Objectif 2 : Analyse de l'impact des protéines contenues dans les exosomes sur les cellules réceptrices

Plusieurs études ont mis en évidence une modification de la composition protéique des exosomes suite à une infection de la cellule donneuse d'exosomes par un pathogène. Par exemple, une augmentation de l'abondance de 41 protéines a été rapportée dans les exosomes sécrétés par des macrophages THP-1 suite à une infection par *Mycobacterium tuberculosis* (Diaz *et al.*, 2016). De plus, des facteurs de virulence bactériens ont été mis en évidence dans les exosomes tels que l'anthrax suite à l'infection par *Bacillus anthracis* (Abrami *et al.*, 2013) ou CagA suite à l'infection par *Helicobacter pylori* (Shimoda *et al.*, 2016).

Ainsi, il serait intéressant d'analyser le contenu protéique des exosomes sécrétés par les cellules infectées par la souche AIEC LF82 par spectrométrie de masse. Cependant, les surnageants de culture des cellules infectées par les bactéries contiennent également les OMV bactériennes co-précipitées avec les exosomes par l'ExoQuick-TCTM et qui pourraient avoir un effet sur les cellules réceptrices. Ainsi, il apparaît intéressant d'utiliser une méthode complémentaire à l'ExoQuick-TCTM pour isoler les exosomes à caractériser afin de s'affranchir des OMV ainsi que des agrégats protéiques. Pour cela, nous proposons d'utiliser les kits Exo-Flow Capture commercialisés par la

société System Biosciences permettant, suite à la précipitation à l'ExoQuick-TC™, l'isolement spécifique des exosomes grâce à des billes magnétiques couplées à un anticorps dirigé contre les marqueurs exosomaux CD9 ou CD63. Bien que la présence des billes magnétiques n'interfère pas avec l'analyse par spectrométrie de masse, il est possible de détacher les exosomes des billes sans en altérer la qualité ni la structure afin de les utiliser pour des analyses en aval. Les OMV bactériens contenues dans la fraction restante pourraient être ensuite à leur tour purifiées par capture sur colonne à l'aide du kit ExoBacteria™ commercialisé par la société System Biosciences afin de s'affranchir des agrégats protéiques restants puis analysées par spectrométrie de masse.

Une première analyse effectuée au laboratoire par le Dr. Carrière en collaboration avec le Dr. Chambon (Plate-Forme d'Exploration du Métabolisme, Inra Theix) a montré la présence de protéines eucaryotes ainsi que de protéines bactériennes dans les exosomes sécrétés par les cellules infectées par la souche AIEC LF82. Cependant, une contamination des échantillons à la kératine a empêché l'identification correcte de toutes les protéines présentes dans ces échantillons. Une nouvelle analyse sera réalisée. Les fonctions des protéines exosomales eucaryotes dans les cellules recevant les exosomes seront étudiées en utilisant des plasmides d'expression ou encore des siARN dirigés contre les ARNm codant pour ces protéines. Les fonctions des protéines exosomales procaryotes seront étudiées en utilisant différents mutants isogéniques des AIEC correspondant aux protéines procaryotes retrouvées dans les exosomes.

III.2 Utilisation des exosomes comme approche diagnostique et thérapeutique

III.2.1 Utilisation des miARN exosomaux comme outil diagnostique pour identifier la présence d'AIEC chez les patients

La composition en miARN des exosomes isolés de fluides biologiques peut varier au cours du développement de différentes pathologies et ainsi servir de marqueur diagnostique ou pronostique (Barile and Vassalli, 2017). A l'heure actuelle, l'identification des bactéries AIEC repose sur l'analyse du phénotype adhérent et invasif des souches *E. coli* isolées de patients en lignées de cellules en culture, un processus long et difficile à standardiser.

Nous avons pour projet d'analyser les profils en miARN des exosomes isolés du sérum des patients atteints de MC porteurs ou non d'AIEC afin d'établir une « signature en miARN exosomaux » pour identifier la présence d'AIEC. Pour cela, nous avons sélectionné 20 patients porteurs et 20 non porteurs d'AIEC d'une cohorte disponible au laboratoire. L'extraction des ARN totaux des exosomes du sérum de ces patients a été réalisée en utilisant plusieurs kits, mais la concentration et la qualité des ARN totaux obtenus sont insuffisantes pour l'analyse par puce miARN. Ainsi, nous avons utilisé le kit Complete SeraMir Exosome RNA Amplification kit (Système Biosciences) permettant d'isoler les exosomes du sérum puis de purifier les ARN totaux

sur colonne, de les réverse-transcrire en ADNc et enfin d'analyser, par RT-PCRq en plaque 384 puits, le niveau de 380 miARN différents. Ces analyses seront réalisées en collaboration avec le Dr Yannick Bidet (Centre Jean Perrin), disposant d'un robot nous permettant de répartir des volumes précis, limitant ainsi les biais dus à la manipulation. Des résultats préliminaires ont été obtenus à partir des miARN des exosomes du sérum de 13 patients atteints de MC et de 10 sujets sains d'une autre cohorte disponible au laboratoire. Les miARNs exosomaux ont été quantifiés par RT-PCRq. Parmi les 24 les miARN ayant été rapportés comme dérégulés dans le sérum et le sang périphérique des patients atteints de MC (Coskun *et al.*, 2012), 8 miARN ont pu être détectés par cette technique et 2 miARN présentent un niveau d'expression significativement augmenté chez les patients atteints de MC, montrant ainsi la faisabilité technique de ce projet et la possibilité d'utiliser les miARN exosomaux comme marqueurs diagnostique.

Tableau 1 : Niveaux des miARN dans les exosomes extraits à partir du sérum des patients atteints de la MC. Les exosomes ont été extraits à partir du sérum des sujets sains et des patients atteints de la MC à l'aide du kit miRNeasy (Qiagen). Les ADN complémentaires (ADNc) ont ensuite été synthétisés à l'aide du kit NCode miRNA cDNA Synthesis (Invitrogen). Les niveaux des miARN circulants associés à la MC dans les exosomes purifiés ont été analysés par RT-PCRq et normalisés par rapport aux miARN de *C. elegans*. Les miARN présentés en gras ont été rapportés comme ayant une expression augmentée et ceux représentés en italique comme ayant une expression diminuée dans le sérum et le sang périphérique des patients atteints de la MC (Coskun *et al.*, 2012). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant un test non paramétrique de Mann-Whitney. Les résultats sont exprimés en moyenne des valeurs \pm l'erreur standard à la moyenne. Ns = non significatif; * $P < 0,05$.

MiARN	Sujets sains (n = 10)	Patients MC (n = 13)	
	Niveau d'expression \pm SEM	Niveau d'expression \pm SEM	<i>P</i> (versus sujet sain)
hsa-miR-16-5p	0,43 \pm 0,33	0,83 \pm 1,68	*
hsa-miR-362-3p	0,82 \pm 0,39	3,42 \pm 1,26	*
hsa-miR-20a-5p	1,24 \pm 0,46	1,65 \pm 1,75	ns
hsa-miR-21-5p	1,12 \pm 0,27	2,08 \pm 0,40	ns
hsa-miR-29a-3p	1,00 \pm 0,18	0,95 \pm 0,14	ns
hsa-miR-195-5p	0,79 \pm 0,39	1,27 \pm 0,43	ns
hsa-miR-199a-5p	1,29 \pm 0,26	1,52 \pm 0,54	ns
hsa-miR-532-3p	1,03 \pm 0,17	6,93 \pm 3,88	ns
hsa-miR-484		Non détectable	
hsa-miR-200c-3p		Non détectable	
hsa-let-7b-5p		Non détectable	
hsa-miR-106a-5p		Non détectable	
hsa-miR-23a-3p		Non détectable	
hsa-miR-140-5p		Non détectable	
hsa-miR-plus-E1271		Non détectable	
hsa-miR-93-5p		Non détectable	
hsa-miR-30e-5p		Non détectable	
hsa-miR-107		Non détectable	
hsa-miR-192-5p		Non détectable	
hsa-miR-126-3p		Non détectable	
hsa-miR-340-3p		Non détectable	
<i>hsa-miR-191-5p</i>		Non détectable	
<i>hsa-miR-149-3p</i>		Non détectable	
<i>hsa-miR-plus-F1065</i>		Non détectable	

III.2.2 Utilisation des exosomes comme vecteurs d'anti-miARN à visée thérapeutique

Les résultats de notre étude montrent que les miR-30c et miR-130a peuvent être transférés de cellules en cellules *via* les exosomes, bloquant l'autophagie et favorisant ainsi la colonisation des bactéries AIEC. Diverses méthodes permettent d'incorporer des molécules au sein d'exosomes isolés, telles que le traitement des cellules donneuses d'exosomes mais également la transfection ou l'électroporation des exosomes eux-mêmes (Bunggulawa *et al.*, 2018) (**Figure 43**). Ainsi, il pourrait être intéressant d'incorporer les anti-sens des miR-30c et miR-130a dans les exosomes sécrétés par les cellules épithéliales intestinales et tenter de les utiliser comme vecteurs *in vivo*.

III.2.2.1 Mise au point de l'incorporation des anti-miARN dans les exosomes

Il a été montré que les exosomes sécrétés par les cellules épithéliales intestinales humaines SK-CO15 et murines CMT-93 contiennent l'annexine A1, se liant aux récepteurs FPR (*formyl peptide receptor*) exprimés à la surface des cellules épithéliales intestinales, activant ainsi une voie favorisant la cicatrisation de l'épithélium (Leoni *et al.*, 2013, 2015). En effet, l'annexine A1 et son produit de clivage Ac2-26 activent les récepteurs FPR, médiant ainsi l'activation des ROS par la NADPH oxydase épithéliale NOX1. Les ROS ainsi générées induisent alors l'inactivation oxydative des phosphatases régulatrices PTEN et PTP-PEST, conduisant ainsi à l'activation de FAK et de la paxilline, favorisant le mouvement des cellules épithéliales intestinales et la cicatrisation des plaies (Leoni *et al.*, 2013). *In vivo*, l'administration intrapéritonéale d'annexine A1 à des souris traitées au DSS favorise la réparation de l'épithélium intestinal (Leoni *et al.*, 2013). Les exosomes contenant l'annexine A1 favorisent la cicatrisation des plaies formées par grattage du tapis cellulaire *in vitro* ou par biopsie réalisée par poinçon de la muqueuse colique *ex vivo* (Leoni *et al.*, 2015). Bien que le rôle de ces exosomes n'ait pas été analysé *in vivo*, l'administration de nanoparticules contenant l'Ac2-26 par voie intrapéritonéale favorise la réparation de l'épithélium intestinal suite à un traitement au DSS en modèle murin, tandis que l'injection de nanoparticules contenant l'annexine A1 dans la muqueuse colique par coloscopie favorise la réparation des plaies formées au niveau de cette muqueuse (Leoni *et al.*, 2015). L'utilisation d'exosomes contenant l'annexine A1 pour l'incorporation des anti-miR-30c et anti-miR-130a présente un double avantage puisque la présence de cette protéine nous assure d'une part que nos exosomes modifiés pourront être capturés par les cellules épithéliales intestinales et d'autre part favorise la réparation de la barrière épithéliale. Ainsi, nous analyserons la présence d'annexine A1 dans les exosomes de cellules épithéliales intestinales humaines T84 et les cellules épithéliales duodénales murines MODE-K disponibles au laboratoire. Une mise au point de la méthode à employer pour intégrer les anti-miR-30c et anti-miR-130a dans les exosomes (par exemple par électroporation ou transfection

à l'Exo-Fect™ commercialisé par Système biosciences ; **Figure 43**) sera effectuée. Ces exosomes contenant les anti-miR-30c et anti-miR-130a seront ensuite utilisés pour stimuler les cellules receveuses afin de diminuer les niveaux des miARNs correspondants dans ces cellules, leur permettant ainsi de mieux contrôler l'élimination de bactéries pathobiontes.

III.2.2.2 Etude de l'effet des exosomes contenant les anti-miARN sur la susceptibilité de l'hôte à l'infection par les bactéries AIEC

Puisque les exosomes contenant des miARN administrés par gavage à des souris peuvent être retrouvés au niveau de la muqueuse intestinale (Manca *et al.*, 2018), les exosomes de cellules murines contenant les anti-miARN seront administrés par gavage chez les souris précédemment infectées avec la souche AIEC LF82 présentant une augmentation des miR-30c et miR-130a dans les cellules épithéliales intestinales. Nous analyserons alors leur capacité à diminuer le niveau de ces miARN dans les cellules épithéliales intestinales et l'impact sur la colonisation et la dissémination bactérienne ainsi que sur l'inflammation. L'utilisation d'anti-miARN marqués serait avantageuse puisqu'elle permettrait de suivre la localisation des anti-miARN.

III.2.3 Utilisation des exosomes comme vaccin contre les bactéries AIEC

Les exosomes pouvant contenir des composants bactériens et pouvant faire de la présentation antigénique, leur utilisation en tant que vaccin contre des pathologies infectieuses a été envisagée. Les études menées sur *Mycobacterium* montrent que les exosomes de cellules infectées par les bactéries pathogènes *M. bovis* ou *M. tuberculosis* ou traitées avec les protéines de *M. tuberculosis* administrés par voie intranasale à des souris peuvent activer des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques d'antigènes et promouvoir l'activation et la maturation de cellules dendritiques et de macrophages (Giri and Schorey, 2008; Giri *et al.*, 2010). De plus, les exosomes issus de cellules infectées par des mycobactéries injectés en intranasal à des souris recrutent les cellules dendritiques CD11b⁺ au niveau pulmonaire (Singh *et al.*, 2012). La vaccination de souris par injection d'exosomes sécrétés par les cellules dendritiques infectées par le parasite *Leishmania major* confère aux souris une protection contre l'infection par ce parasite (Schnitzer *et al.*, 2010). Chez la souris, les exosomes de cellules dendritiques pulsées avec les antigènes dérivés de *Toxoplasma gondii* sont capables de protéger les souris syngéniques et allogéniques de l'infection orale par ce parasite (Beauvillain *et al.*, 2007). De même, l'injection de ces exosomes chez la mère avant gestation confère une protection contre la toxoplasmose congénitale à sa descendance (Beauvillain *et al.*, 2009). Ainsi, les exosomes de cellules dendritiques ou de macrophages murins dérivés de la moelle osseuse infectés par les bactéries AIEC pourraient être utilisés comme vaccin afin de protéger les souris contre une future infection par la bactérie.

Afin d'examiner si les exosomes de cellules infectées par les AIEC peuvent être utilisés comme vaccin, les exosomes de cellules dendritiques ou de macrophage murins primaires dérivés à partir de la moelle osseuse de souris et infectés ou non avec les bactéries AIEC seront isolés à l'aide de la solution ExoQuick™. Les exosomes purifiés seront administrés par voie intraveineuse à des souris CEABAC10. Une mise au point sur la dose d'exosomes, le nombre d'administrations ainsi que le temps nécessaire pour que la réponse immunitaire se mette en place sera réalisée. Les souris seront ensuite infectées avec la souche AIEC LF82 comme décrit précédemment par le laboratoire (Carvalho *et al.*, 2009). Les souris seront sacrifiées et différentes analyses seront réalisées :

- Le score histologique sera établi comme décrit précédemment (Carvalho *et al.*, 2009) en utilisant des coupes histologiques de l'iléon et du côlon colorées par hématoxiline et éosine.
- La colonisation intestinale et la dissémination des bactéries AIEC (iléon, côlon, rate, ganglions mésentériques) seront analysées par étalement des broyats tissulaires sur gélose.
- La production des cytokines ou chimiokines pro-inflammatoires au niveau du côlon et de l'iléon sera analysée par ELISA.
- Le recrutement des cellules immunitaires (neutrophiles, macrophages (F4/80⁺), cellules T et cellules dendritiques) au niveau intestinal sera analysé par cytométrie en flux.
- La présence d'anticorps anti-AIEC (IgA ou IgG au niveau sérique) sera recherchée par ELISA.
- L'activation des lymphocytes T et des cellules dendritiques sera analysée :

→ *In vitro* : Les exosomes sécrétés par les macrophages murins J774 infectés ou non avec la souche LF82 seront incubés avec des lymphocytes T totaux isolés de la rate de souris infectées avec la souche LF82. L'expression d'IFN- γ dans les cellules T CD8⁺ et T CD4⁺ sera analysée par cytométrie en flux. L'activation des cellules T par les exosomes sera évaluée en mesurant la prolifération cellulaire et en analysant l'expression de CD69, un marqueur de l'activation des cellules T (Cosulich *et al.*, 1987). Pour mesurer la prolifération cellulaire, les cellules seront marquées avec le colorant CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*) avant traitement par les exosomes. Comme il a été montré que l'activation de lymphocytes T par les exosomes est favorisée par la présentation des antigènes exosomaux par les cellules présentatrices d'antigènes, les mêmes expériences seront réalisées en présence de cellules dendritiques murines dérivées de la moelle osseuse.

En parallèle, les exosomes sécrétés par les macrophages murins J774 infectés ou non avec les AIEC seront incubés avec les cellules dendritiques murines dérivées de la moelle osseuse. Le niveau intracellulaire d'IL-12p40 sera mesuré puisque cette cytokine est nécessaire pour la stimulation des réponses Th1 et est un marqueur classique de l'activation des cellules dendritiques (Morelli, 2001). Afin d'évaluer la maturation des cellules dendritiques, l'expression de CD63, CD86 et du CMH de classe II sera analysée. Nous nous attendons à ce que le traitement des cellules dendritiques avec

les exosomes isolés de macrophages infectés par les bactéries AIEC, mais pas de macrophages non infectés, entraîne une augmentation de l'expression de ces marqueurs.

→ *Ex vivo* : les ganglions mésentériques et la rate des souris traitées avec les Exo-NI, les Exo-HS et les Exo-LF82 seront isolés. L'expression des marqueurs des cellules T CD4⁺ mémoire effectrices ou CD8⁺ mémoire effectrices (CD44^{hi} et CD62L^{low}) sera déterminée par cytométrie en flux. Des suspensions cellulaires préparées à partir de ces tissus seront stimulées *ex vivo* avec les protéines du surnageant de culture filtré (CFP, *culture filtered proteins*) de la souche LF82 préparées comme décrit précédemment (Kumar *et al.*, 2010) ou avec le lysat de la souche LF82. La prolifération, la production d'IFN- γ et le phénotype mémoire des cellules T seront analysés comme décrit précédemment (Giri *et al.*, 2010). Nous nous attendons à ce que des cellules T mémoire effectrices aient été produites chez des souris traitées avec les Exo-LF82 et à ce que les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ isolés des souris traitées avec les Exo-LF82 mais pas ceux isolés des souris traitées avec les Exo-NI présentent une prolifération accrue suite à leur restimulation *ex vivo* avec le CFP ou le lysat bactérien.

III.3 Identification du ou des récepteur(s) autophagique(s) mis en jeu dans la reconnaissance des AIEC par l'autophagie

- **Etude de l'influence des polymorphismes associés à la MC dans les gènes codant pour les récepteurs autophagiques sur le contrôle de la multiplication intracellulaire des AIEC**

La présence d'un polymorphisme d'un seul nucléotide, Val248Ala, dans le gène *NDP52*, variant à risque pour la MC (Ellinghaus *et al.*, 2013), a été analysée par le laboratoire dans une cohorte de patients atteints de MC (n = 95), de RCH (n = 30) et des sujets sains (n = 14) au cours du protocole MACRO2 « Etude du comportement des macrophages vis-à-vis des *E. coli* adhérents et invasifs isolés de patients atteints de maladie de Crohn en fonction des facteurs de susceptibilité de l'hôte ». Les macrophages dérivés des monocytes de ces patients ont été infectés avec la souche AIEC LF82 (avec une MOI de 10), et le nombre de bactéries LF82 à 1 h et à 10 h post-infection a été déterminé par un test de protection à la gentamicine. Les résultats obtenus montrent que la présence du SNP *NDP52*^{Val248Ala} augmente la proportion de patients atteints de MC présentant un nombre de LF82 intra-macrophagiques à 10 h post-infection plus élevé que la médiane.

Tableau 2 : La présence du SNP *NDP52*^{Val248Ala} augmente la proportion de patients présentant un nombre d'AIEC intra-macrophagiques plus élevé. La présence du polymorphisme *NDP52*^{Val248Ala} a été déterminée chez les patients Crohn, RCH ou les sujets contrôles dans le cadre de l'étude MACRO2, une étude monocentrique dont les patients ont été inclus à Clermont-Ferrand et menée par le Dr. Anthony Buisson. Les monocytes du sang périphérique des individus ont été dérivés en macrophages et la capacité de survie de la souche AIEC LF82 à 10 h a été analysée par un test de protection à la gentamicine. Pour chaque groupe (MC, RCH ou contrôle), la valeur médiane du nombre de bactéries LF82 intracellulaires à 10 h de

tous les individus a été déterminée. La proportion d'individus dans chaque groupe présentant un nombre de LF82 intra-macrophagiques à 10 h post-infection \leq ou $>$ la médiane a été calculée. La différence statistique entre ces deux proportions a été analysée en utilisant un test Chi-square.

	NDP52		p-value	NDP52 ^{Val248Ala}		p-value
	\leq médiane	$>$ médiane		\leq médiane	$>$ médiane	
Contrôle	50,00% (6)	50,00% (6)	ns	50,00% (1)	50,00% (1)	ns
RCH	50,00% (14)	50,00% (14)	ns	50,00% (1)	50,00% (1)	ns
MC	53,49% (46)	46,51% (40)	ns	22,22% (2)	77,7% (7)	*P = 0,0371

Ce résultat suggère que le variant de risque *NDP52*^{Val248Ala} entraîne un défaut de la reconnaissance des bactéries AIEC par l'autophagie, et par conséquent une augmentation de la multiplication intracellulaire des bactéries AIEC. Pour confirmer ces résultats, les cellules HeLa/CRISPR-Cas9 déficientes pour *NDP52* seront transfectées avec un vecteur d'expression codant soit pour la protéine *NDP52* sauvage, soit pour la protéine *NDP52*^{Val248Ala}, et la multiplication des bactéries AIEC dans ces cellules sera analysée. Enfin, les cellules seront infectées avec la souche LF82-GFP et un marquage par immunofluorescence sera réalisé afin de déterminer si la protéine *NDP52*^{Val248Ala} peut colocaliser avec les bactéries AIEC comme la protéine sauvage pourrait potentiellement le faire.

De même, une diminution de l'expression de l'OPTN associée à la présence d'un SNP dans le gène *OPTN* a été observée chez environ 10 % des patients atteints de MC (Smith *et al.*, 2015). Il serait intéressant de voir si la présence de ce SNP altère le ciblage des bactéries AIEC par la machinerie autophagique dans des macrophages de patients atteints de MC porteurs ou non de ce polymorphisme.

- **Etude du mécanisme de ciblage des bactéries AIEC via les récepteurs autophagiques**

- **Implication des ubiquitines et ubiquitine ligases** : Puisque les récepteurs autophagiques reconnaissent les protéines ubiquitine fixées sur la bactérie intracellulaire, il serait intéressant d'analyser quelle(s) ubiquitine ligase(s) sont impliquées dans l'ubiquitinylation des bactéries AIEC. Il a par exemple été rapporté que l'ubiquitine ligase Parkin permet l'ubiquitinylation de *Mycobacterium tuberculosis* et le ciblage de cette bactérie à l'autophagosome via les récepteurs p62 et NDP52 (Manzanillo *et al.*, 2013). *M. tuberculosis* peut également être polyubiquitinylée par SMURF1, de même que *Listeria monocytogenes* (Franco *et al.*, 2017). D'autres E3-ubiquitine ligases sont responsables de l'ubiquitinylation de pathogènes telles que LRSAM1 (*Leucine Rich Repeat And Sterile Alpha Motif Containing 1*) (Huett *et al.*, 2012), ARIH (*RING1-IBR-RING2 (RBR) ubiquitin ligase*) (Polajnar *et al.*, 2017), RNF166 (Heath *et al.*, 2016) et le complexe LUBAC (Noad *et al.*, 2017). L'implication de ces différentes ubiquitine ligases pourra être étudiée par transfection des cellules avec des siARN dirigés contre les ARNm correspondants, puis observation

du nombre de bactéries AIEC ubiquitinylées et de la colocalisation avec LC3 en microscopie confocale et analyse de la réplication intracellulaire des AIEC par un test de protection à la gentamicine.

- **Implication de protéines régulant le recrutement des récepteurs autophagiques à la bactérie cible** : Il a récemment été montré que la GTPase Rab35 permet le recrutement de NDP52 à ses cibles, que ce soit des bactéries ou des mitochondries (Minowa-Nozawa *et al.*, 2017). La kinase TBK1 favorise également le recrutement de NDP52 et de Rab35 aux bactéries intracellulaires (Minowa-Nozawa *et al.*, 2017). Ainsi, dans le cas de l'implication de NDP52 dans l'élimination des bactéries AIEC par l'autophagie, il serait intéressant d'étudier l'implication de la GTPase Rab35 et de TBK1. L'implication de Rab35 dans le ciblage des AIEC à l'autophagosome par NDP52 pourrait être analysée en utilisant un siARN dirigé contre Rab35 et en observant ensuite le recrutement de NDP52 aux bactéries AIEC, la colocalisation avec LC3 et Rab35 par immunofluorescence et la réplication intracellulaire de ces bactéries. L'implication de la kinase TBK1 dans le recrutement de Rab35 et de NDP52 aux AIEC intracellulaires pourrait être étudiée en utilisant un inhibiteur de TBK1, le BX795, ou en diminuant son expression par transfection d'un siARN et en observant ensuite la colocalisation entre Rab35, NDP52, LC3 et les AIEC en microscopie confocale.

- **Implication des galectines** : En plus de l'ubiquitine, les galectines jouent aussi un rôle important dans le ciblage des bactéries à l'autophagosome. NDP52 peut se lier à la galectine 8 de la vacuole endommagée contenant les *Salmonella Typhimurium* afin d'éliminer ces bactéries *via* l'autophagie sélective (Thurston *et al.*, 2012). Dans le cas où l'implication du récepteur NDP52 serait confirmée, nous analyserons si le ciblage des bactéries AIEC aux autophagosomes par ce récepteur peut passer par la reconnaissance de la galectine 8. L'implication de la galectine 8 pourra être déterminée par observation de la colocalisation entre les bactéries AIEC, LC3 et la galectine 8 en microscopie confocale, mais également par transfection des cellules T84 avec un siARN dirigé contre la galectine 8 et analyse de la capacité de réplication intracellulaire des bactéries AIEC par un test de protection à la gentamicine.

- **Etude du rôle des récepteurs autophagiques dans les autres étapes du processus autophagique que dans le ciblage les bactéries aux autophagosomes**

En plus de cibler les bactéries aux autophagosomes, les récepteurs de l'autophagie peuvent agir à d'autres niveaux du processus autophagique afin de permettre son bon déroulement. L'OPTN favoriserait le recrutement du complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 aux phagophores contenant WIPI2 en interagissant avec ATG5, favorisant ainsi la production de LC3-II et la maturation du phagophore (Bansal *et al.*, 2018). Plusieurs récepteurs de l'autophagie et notamment NDP52, OPTN

et TAX1BP1 sont impliqués dans la maturation de l'autophagosome en interagissant avec la myosine VI, permettant ainsi la formation de l'autolysosome (Tumbarello *et al.*, 2012, 2015; Verlhac *et al.*, 2015). Ces fonctions de récepteurs autophagiques seront étudiées dans le contexte de l'infection par des bactéries AIEC. L'impact des polymorphismes dans les gènes *NDP52* et *OPTN* associés à la MC sur ces fonctions pourrait être analysé.

IV. Conclusion générale

Les travaux menés au cours de cette thèse ont révélé le mécanisme par lequel les exosomes sécrétés par les cellules épithéliales intestinales infectées par les bactéries AIEC limitent l'autophagie dans les cellules épithéliales intestinales adjacentes, favorisant ainsi la réplication intracellulaire des AIEC et plus généralement de bactéries pathobiontes. Cependant, cette étude n'a porté que sur l'impact des exosomes dans l'interaction entre les cellules épithéliales intestinales. Au niveau physiologique, les exosomes des cellules épithéliales intestinales se retrouvent probablement en contact avec d'autres types cellulaires, tels que les cellules immunitaires de la *lamina propria*, et pourraient alors moduler leur réponse à l'infection par les bactéries AIEC. De plus, les exosomes sécrétés par les cellules épithéliales intestinales pourraient, en réponse à l'infection par les AIEC, favoriser le recrutement de différentes populations de cellules immunitaires dans la *lamina propria*, pouvant ainsi avoir un impact sur l'inflammation. De même, les défauts de barrière épithéliale observée chez les patients atteints de MC facilitent le passage des bactéries AIEC au niveau de la *lamina propria*, qui peuvent alors infecter les macrophages et les neutrophiles sécrétant eux aussi des exosomes pouvant avoir un effet sur les cellules adjacentes. Il apparaît donc nécessaire d'étudier l'impact de l'infection par les bactéries AIEC sur les exosomes sécrétés par les différentes populations cellulaires présentes au niveau de la *lamina propria* et leurs effets réciproques sur ces mêmes cellules.

Ainsi, l'infection par les bactéries AIEC peut impacter le contenu de l'ensemble des exosomes sécrétés par les différentes populations cellulaires au niveau systémique. L'analyse du profil en miARN des exosomes du sérum des patients atteints de MC pourrait permettre de diagnostiquer d'une manière non invasive la présence des bactéries AIEC. De plus, l'utilisation des exosomes en tant que vecteur pour l'administration de molécules thérapeutiques telles que les anti-sens des miR-30c et 130a pourrait être envisagée. L'administration de ces anti-miARN pourrait potentiellement permettre d'inhiber la colonisation par les AIEC, à la fois au niveau local et systémique, chez les patients atteints de MC. Enfin, les exosomes étant capables de faire de la présentation antigénique de manière directe ou indirecte et ces vésicules contenant probablement des antigènes bactériens, leur utilisation comme « vaccin » afin de protéger les patients contre l'infection par les AIEC pourrait être envisagée.

Un autre axe de ce travail de thèse visait à identifier les acteurs clés de la machinerie autophagique impliqués dans le ciblage et la dégradation des bactéries AIEC ainsi qu'à décortiquer les mécanismes sous-jacents. Il apparaît également nécessaire d'étudier l'impact des variants de risque des gènes codant pour ces acteurs sur le contrôle des AIEC par l'autophagie.

Ensemble, ces études contribueront à la compréhension des multiples aspects de l'interaction entre l'hôte et les bactéries AIEC pathogènes associées à MC et permettront à l'avenir de mieux comprendre la pathogenèse et de faciliter le diagnostic et le traitement de cette maladie. Les travaux menés sur les exosomes ont donné lieu à la soumission d'un article dans le journal Gut Microbes. Cette étude a également fait l'objet de plusieurs présentations orales et affichées à des congrès nationaux et internationaux et a été récompensée par plusieurs prix (voir Valorisation Scientifique en Annexe).

TROISIÈME PARTIE

– Références Bibliographiques –

A

- Abraham, C., and Cho, J. (2009). Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *15*, 1090–1100.
- Abrami, L., Brandi, L., Moayeri, M., Brown, M.J., Krantz, B.A., Leppla, S.H., and van der Goot, F.G. (2013). Hijacking Multivesicular Bodies Enables Long-Term and Exosome-Mediated Long-Distance Action of Anthrax Toxin. *Cell Rep.* *5*, 986–996.
- Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: How bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 131–143.
- Admyre, C., Johansson, S.M., Paulie, S., and Gabrielsson, S. (2006). Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *Eur. J. Immunol.* *36*, 1772–1781.
- Adolph, T.E., Tomczak, M.F., Niederreiter, L., Ko, H.-J., Böck, J., Martinez-Naves, E., Glickman, J.N., Tschurtschenthaler, M., Hartwig, J., Hosomi, S., et al. (2013). Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature* *503*, 272–276.
- Aguilar, C., Mano, M., and Eulalio, A. (2019). MicroRNAs at the Host–Bacteria Interface: Host Defense or Bacterial Offense. *Trends Microbiol.* *27*, 206–218.
- Agus, A., Denizot, J., Thévenot, J., Martinez-Medina, M., Massier, S., Sauvanet, P., Bernalier-Donadille, A., Denis, S., Hofman, P., Bonnet, R., et al. (2016). Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. *Sci. Rep.* *6*, 1–14.
- Ahluwalia, B., Magnusson, M.K., and Öhman, L. (2017). Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scand. J. Gastroenterol.* *52*, 1185–1193.
- Ahmed, I., Greenwood, R., Costello, B., Ratcliffe, N., and Probert, C.S. (2016). Investigation of faecal volatile organic metabolites as novel diagnostic biomarkers in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *43*, 596–611.
- Akers, J.C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B.S., and Chen, C.C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neurooncol.* *113*, 1–11.
- Alexander, M., Hu, R., Runtsch, M.C., Kagele, D.A., Mosbrugger, T.L., Tolmachova, T., Seabra, M.C., Round, J.L., Ward, D.M., and O’Connell, R.M. (2015). Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat. Commun.* *6*.
- Aline, F., Bout, D., Amigorena, S., Dimier-poisson, I., and Roingeard, P. (2004). *Toxoplasma gondii* Exosomes Induce a Protective Immune Response against *T. gondii* Infection. *Infect. Immun.* *72*, 4127–4137.
- Alipoor, S.D., Mortaz, E., Tabarsi, P., Farnia, P., Mirsaedi, M., Garssen, J., Movassaghi, M., and Adcock, I.M. (2017). *Bovis Bacillus Calmette–Guerin (BCG)* infection induces exosomal miRNA release by human macrophages. *J. Transl. Med.* *15*, 105.
- Alipoor, S.D., Adcock, I.M., Folkerts, G., Garssen, J., and Mortaz, E. (2019). A bioinformatics analysis of exosomal microRNAs released following mycobacterial infection. *Int. J. Mycobacteriology* *8*, 218–222.
- Alsaadi, R.M., Losier, T.T., Tian, W., Jackson, A., Guo, Z., Rubinsztein, D.C., and Russell, R.C. (2019). ULK1-mediated phosphorylation of ATG16L1 promotes xenophagy, but destabilizes the ATG16L1 Crohn’s mutant. *EMBO Rep.* e46885.
- Altan-Bonnet, N., Perales, C., and Domingo, E. (2019). Extracellular vesicles: Vehicles of en bloc viral transmission. *Virus Res.* *265*, 143–149.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakkh, S., and Wood, M.J.A. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* *29*, 341–345.
- Anand, P.K., Anand, E., Bleck, C.K.E., Anes, E., and Griffiths, G. (2010). Exosomal hsp70 induces a pro-inflammatory response to foreign particles including mycobacteria. *PLoS One* *5*.
- Ananthakrishnan, A.N., Higuchi, L.M., Huang, E.S., Khalili, H., Richter, J.M., Fuchs, C.S., and Chan, A.T. (2012). Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Ann. Intern. Med.* *156*, 350–359.
- Ananthakrishnan, A.N., Luo, C., Yajnik, V., Khalili, H., Garber, J.J., Stevens, B.W., Cleland, T., and Xavier, R.J. (2017). Gut Microbiome Function Predicts Response to Anti-integrin Biologic Therapy in Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Host Microbe* *21*, 603–610.e3.
- Anderson, J.L., Edney, R.J., and Whelan, K. (2012). Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *36*, 503–516.
- Antimisiaris, S.G., Mourtas, S., and Marazioti, A. (2018). Exosomes and exosome-inspired vesicles for targeted drug delivery. *Pharmaceutics* *10*.
- Arenaccio, C., and Federico, M. (2017). The Multifaceted Functions of Exosomes in Health and Disease: An Overview. pp. 3–19.
- Argüelles-Arias, F., Chaaro Benallal, D., Benítez, J.M., Perea Amarillo, R., Iglesias, E., Castro Laria, L., Sánchez García, V., Maldonado Pérez, M.B., Vilches, Á., Caunedo Álvarez, Á., et al. (2017). Evolution of the incidence of inflammatory bowel disease in Southern Spain. *Rev. Española Enfermedades Dig.* *109*, 757–760.
- Asano, J., Sato, T., Ichinose, S., Kajita, M., Onai, N., Shimizu, S., and Ohteki, T. (2017). Intrinsic Autophagy Is Required for the Maintenance of Intestinal Stem Cells and for Irradiation-Induced Intestinal Regeneration. *Cell Rep.* *20*, 1050–1060.
- Aschard, H., Laville, V., Tchetgen, E.T., Knights, D., Imhann, F., Seksik, P., Zaitlen, N., Silverberg, M.S., Cosnes, J., Weersma, R.K., et al. (2019). Genetic effects on the commensal microbiota in inflammatory bowel disease patients. *PLOS Genet.* *15*, e1008018.

- Axelrad, J.E., Lichtiger, S., and Yajnik, V. (2016). Inflammatory bowel disease and cancer: The role of inflammation, immunosuppression, and cancer treatment. *World J. Gastroenterol.* 22, 4794.
- Al Azzaz, J., Rieu, A., Aires, V., Delmas, D., Chluba, J., Winckler, P., Bringer, M.-A., Lamarche, J., Vervandier-Fasseur, D., Dalle, F., et al. (2019). Resveratrol-Induced Xenophagy Promotes Intracellular Bacteria Clearance in Intestinal Epithelial Cells and Macrophages. *Front. Immunol.* 9, 3149.

B

- B'chir, W., Maurin, A.-C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2013). The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* 41, 7683–7699.
- Bach, J.-F. (2002). The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases. *N. Engl. J. Med.* 347, 911–920.
- Baixaui, F., López-Otín, C., and Mittelbrunn, M. (2014). Exosomes and autophagy: Coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. *Front. Immunol.* 5, 1–6.
- van Balkom, B.W.M., Eisele, A.S., Pegtel, D.M., Bervoets, S., and Verhaar, M.C. (2015). Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting. *J. Extracell. Vesicles* 4, 26760.
- Band, V., and Weiss, D. (2014). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics* 4, 18–41.
- Bandu, R., Oh, J.W., and Kim, K.P. (2019). Mass spectrometry-based proteome profiling of extracellular vesicles and their roles in cancer biology. *Exp. Mol. Med.* 51, 30.
- Bansal, M., Moharir, S.C., and Swarup, G. (2018). Autophagy receptor optineurin promotes autophagosome formation by potentiating LC3-II production and phagophore maturation. *Commun. Integr. Biol.* 11, 1–4.
- Barclay, A.R., Russell, R.K., Wilson, M.L., Gilmour, W.H., Satsangi, J., and Wilson, D.C. (2009). Systematic Review: The Role of Breastfeeding in the Development of Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *J. Pediatr.* 155, 421–426.
- Barile, L., and Vassalli, G. (2017). Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. *Pharmacol. Ther.* 174, 63–78.
- Barnich, N., Boudeau, J., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2003). Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol. Microbiol.* 48, 781–794.
- Barnich, N., Carvalho, F.A., Glasser, A., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., Peeters, H., Bommelaer, G., Desreumaux, P., Colombel, J.-F., et al. (2007). CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J. Clin. Invest.* 117, 1566–1574.
- Barrett, J.C., Hansoul, S., Nicolae, D.L., Cho, J.H., Duerr, R.H., Rioux, J.D., Brant, S.R., Silverberg, M.S., Taylor, K.D., Barmada, M.M., et al. (2008). Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat. Genet.* 40, 955–962.
- Di Bartolomeo, S., Corazzari, M., Nazio, F., Oliverio, S., Lisi, G., Antonioli, M., Pagliarini, V., Matteoni, S., Fuoco, C., Giunta, L., et al. (2010). The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J. Cell Biol.* 191, 155–168.
- Basset, C., Holton, J., Bazeos, A., Vaira, D., and Bloom, S. (2004). Are Helicobacter species and enterotoxigenic Bacteroides fragilis involved in inflammatory bowel disease? *Dig. Dis. Sci.* 49, 1425–1432.
- Bäumler, A.J., Tsolis, R.M., and Heffron, F. (1996). The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of Salmonella typhimurium to murine Peyer's patches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 279–283.
- Le Baut, G., O'Brien, C., Pavli, P., Roy, M., Seksik, P., Tréton, X., Nancey, S., Barnich, N., Bezault, M., Auzolle, C., et al. (2018). Prevalence of Yersinia Species in the Ileum of Crohn's Disease Patients and Controls. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 1–9.
- Beauvillain, C., Ruiz, S., Guiton, R., Bout, D., and Dimier-Poisson, I. (2007). A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against T. gondii infection in syngeneic and allogeneic mice. *Microbes Infect.* 9, 1614–1622.
- Beauvillain, C., Juste, M.O., Dion, S., Pierre, J., and Dimier-Poisson, I. (2009). Exosomes are an effective vaccine against congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine* 27, 1750–1757.
- Bel, S., Pendse, M., Wang, Y., Li, Y., Ruhn, K.A., Hassell, B., Leal, T., Winter, S.E., Xavier, R.J., and Hooper, L. V. (2017). Paneth cells secrete lysozyme via secretory autophagy during bacterial infection of the intestine. *Science* (80-.). 357, 1047–1052.
- Benjamin, J.L., Hedin, C.R.H., Koutsoumpas, A., Ng, S.C., McCarthy, N.E., Prescott, N.J., Pessoa-Lopes, P., Mathew, C.G., Sanderson, J., Hart, A.L., et al. (2012). Smokers with active Crohn's disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota*. *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 1092–1100.
- Béres, N.J., Kiss, Z., Sztupinszki, Z., Lendvai, G., Arató, A., Sziksz, E., Vannay, Á., Szabó, A.J., Müller, K.E., Cseh, Á., et al. (2017). Altered mucosal expression of microRNAs in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Dig. Liver Dis.* 49, 378–387.
- Bertuccini, L., Costanzo, M., Iosi, F., Tinari, A., Terruzzi, F., Stronati, L., Aloï, M., Cucchiara, S., and Superti, F. (2014). Lactoferrin prevents invasion and inflammatory response following E. coli strain LF82 infection in experimental model of Crohn's disease. *Dig. Liver Dis.* 46, 496–504.
- Beveridge, T.J. (1999). *Beveridge 1999*. 181, 1–9.
- Bhatnagar, S., and Schorey, J.S. (2007). Exosomes Released from Infected Macrophages Contain Mycobacterium

- avium Glycopeptidolipids and Are Proinflammatory. *J. Biol. Chem.* 282, 25779–25789.
- Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F.J., and Schorey, J.S. (2007). Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* 110, 3234–3244.
- Bian, Z., Li, L., Cui, J., Zhang, H., Liu, Y., Zhang, C.-Y., and Zen, K. (2011). Role of miR-150-targeting c-Myb in colonic epithelial disruption during dextran sulphate sodium-induced murine experimental colitis and human ulcerative colitis. *J. Pathol.* 225, 544–553.
- Birgisdottir, Å.B., Lamark, T., and Johansen, T. (2013). The LIR motif - crucial for selective autophagy. *J. Cell Sci.* 126, 3237–3247.
- Bolukbasi, M.F., Mizrak, A., Ozdener, G.B., Madlener, S., Ströbel, T., Erkan, E.P., Fan, J.B., Breakefield, X.O., and Saydam, O. (2012). MiR-1289 and “zipcode”-like sequence enrich mRNAs in microvesicles. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 1, e10.
- Borges, F.T., Melo, S.A., Özdemir, B.C., Kato, N., Revuelta, I., Miller, C.A., Gattone, V.H., LeBleu, V.S., and Kalluri, R. (2013). TGF- β 1-Containing Exosomes from Injured Epithelial Cells Activate Fibroblasts to Initiate Tissue Regenerative Responses and Fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 24, 385–392.
- Bosca-Watts, M.M. (2015). Pathogenesis of Crohn’s disease: Bug or no bug. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 6, 1.
- Bossuyt, P., Verhaegen, J., Van Assche, G., Rutgeerts, P., and Vermeire, S. (2009). Increasing incidence of Clostridium difficile-associated diarrhea in inflammatory bowel disease. *J. Crohn’s Colitis* 3, 4–7.
- Boudeau, J., Glasser, A.L., Masseret, E., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A. (1999). Invasive ability of an Escherichia coli strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn’s disease. *Infect. Immun.* 67, 4499–4509.
- Boudeau, J., Barnich, N., and Darfeuille-Michaud, A. (2001). Type 1 pili-mediated adherence of Escherichia coli strain LF82 isolated from Crohn’s disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 39, 1272–1284.
- Boudeau, J., Glasser, A.-L., Julien, S., Colombel, J.-F., and Darfeuille-Michaud, A. (2003). Inhibitory effect of probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive E. coli strains isolated from patients with Crohn’s disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18, 45–56.
- Boyapati, R., Satsangi, J., and Tzer Ho, G. (2015). Pathogenesis of Crohn’s disease. *F1000Prime Rep.* 7.
- Boyd, M., Thodberg, M., Vitezic, M., Bornholdt, J., Vitting-Seerup, K., Chen, Y., Coskun, M., Li, Y., Lo, B.Z.S., Klausen, P., et al. (2018). Characterization of the enhancer and promoter landscape of inflammatory bowel disease from human colon biopsies. *Nat. Commun.* 9, 1661.
- Boyle, K.B., and Randow, F. (2013). The role of “eat-me” signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 339–348.
- Brady, O.A., Jeong, E., Martina, J.A., Pirooznia, M., Tunc, I., and Puertollano, R. (2018). The transcription factors TFE3 and TFEB amplify p53 dependent transcriptional programs in response to DNA damage. *Elife* 7, 1–34.
- Brand, S. (2009). Crohn’s disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn’s disease. *Gut* 58, 1152–1167.
- Brest, P., Lapaquette, P., Souidi, M., Lebrigand, K., Cesaro, A., Vouret-Craviari, V., Mari, B., Barbry, P., Mosnier, J.-F., Hébuterne, X., et al. (2011). A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn’s disease. *Nat. Genet.* 43, 242–245.
- Bretin, A., Carrière, J., Dalmaso, G., Bergougnoux, A., B’chir, W., Maurin, A.C., Müller, S., Seibold, F., Barnich, N., Bruhat, A., et al. (2016). Activation of the EIF2AK4-EIF2A/eIF2 α -ATF4 pathway triggers autophagy response to Crohn disease-associated adherent-invasive Escherichia coli infection. *Autophagy* 12, 770–783.
- Bretin, A., Lucas, C., Larabi, A., Dalmaso, G., Billard, E., Barnich, N., Bonnet, R., and Nguyen, H.T.T. (2018). AIEC infection triggers modification of gut microbiota composition in genetically predisposed mice, contributing to intestinal inflammation. *Sci. Rep.* 8, 12301.
- Bringer, M.-A., Barnich, N., Glasser, A.-L., Bardot, O., and Darfeuille-Michaud, A. (2005). HtrA stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent and invasive Escherichia coli strain LF82 isolated from a patient with Crohn’s disease. *Infect. Immun.* 73, 712–721.
- Bringer, M.-A., Rolhion, N., Glasser, A.-L., and Darfeuille-Michaud, A. (2007). The Oxidoreductase DsbA Plays a Key Role in the Ability of the Crohn’s Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli Strain LF82 To Resist Macrophage Killing. *J. Bacteriol.* 189, 4860–4871.
- Bringer, M.A., Billard, E., Glasser, A.L., Colombel, J.F., and Darfeuille-Michaud, A. (2012). Replication of Crohn’s disease-associated AIEC within macrophages is dependent on TNF- α secretion. *Lab. Investig.* 92, 411–419.
- Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., and Kagan, J.C. (2015). Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 257–290.
- Buisson, A., Chevaux, J.B., Allen, P.B., Bommelaer, G., and Peyrin-Biroulet, L. (2012). Review article: The natural history of postoperative Crohn’s disease recurrence. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 35, 625–633.
- Bunggulawa, E.J., Wang, W., Yin, T., Wang, N., Durkan, C., Wang, Y., and Wang, G. (2018). Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. *J. Nanobiotechnology* 16, 81.
- Burisch, J., Jess, T., Martinato, M., and Lakatos, P.L. (2013). The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J. Crohn’s Colitis* 7, 322–337.
- Buschow, S.I., Nolte-’t Hoen, E.N.M., van Niel, G., Pols, M.S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C.J.M., Raposo, G., Wubbolts, R., et al. (2009). MHC II in Dendritic Cells is Targeted to Lysosomes or T Cell-Induced Exosomes Via Distinct Multivesicular Body Pathways. *Traffic* 10, 1528–1542.

C

- Cabrera, S., Fernández, Á.F., Mariño, G., Aguirre, A., Suárez, M.F., Español, Y., Vega, J.A., Laurà, R., Fueyo, A., Fernández-García, M.S., et al. (2013). ATG4B/autophagin-1 regulates intestinal homeostasis and protects mice from experimental colitis. *Autophagy* 9, 1188–1200.
- Cadwell, K., Liu, J.Y., Brown, S.L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J.K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J.A., Hunt, S., et al. (2008). A key role for autophagy and the autophagy gene Atg1611 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 456, 259–263.
- Cadwell, K., Patel, K.K., Maloney, N.S., Liu, T.-C., Ng, A.C.Y., Storer, C.E., Head, R.D., Xavier, R., Stappenbeck, T.S., and Virgin, H.W. (2010). Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn’s disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell* 141, 1135–1145.
- Cai, Z., Zhang, W., Yang, F., Yu, L., Yu, Z., Pan, J., Wang, L., Cao, X., and Wang, J. (2012). Immunosuppressive exosomes from TGF- β 1 gene-modified dendritic cells attenuate Th17-mediated inflammatory autoimmune disease by inducing regulatory T cells. *Cell Res.* 22, 607–610.
- Campana, S., De Pasquale, C., Carrega, P., Ferlazzo, G., and Bonaccorsi, I. (2015). Cross-dressing: An alternative mechanism for antigen presentation. *Immunol. Lett.* 168, 349–354.
- Campbell-Valois, F.-X., Sachse, M., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (2015). Escape of Actively Secreting *Shigella flexneri* from ATG8/LC3-Positive Vacuoles Formed during Cell-To-Cell Spread Is Facilitated by IcsB and VirA. *MBio* 6, 1–11.
- Campbell, H.K., Maiers, J.L., and DeMali, K.A. (2017). Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Exp. Cell Res.* 358, 39–44.
- Camprubí-Font, C., Lopez-Siles, M., Ferrer-Guixeras, M., Niubó-Carulla, L., Abellà-Ametller, C., Garcia-Gil, L.J., and Martínez-Medina, M. (2018). Comparative genomics reveals new single-nucleotide polymorphisms that can assist in identification of adherent-invasive *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 8, 2695.
- Camprubí-Font, C., Ewers, C., Lopez-Siles, M., and Martínez-Medina, M. (2019). Genetic and Phenotypic Features to Screen for Putative Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 10, 1–11.
- Cani, P.D. (2018). Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* 67, 1716–1725.
- Cario, E., and Podolsky, D.K. (2000). Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect. Immun.* 68, 7010–7017.
- Carrière, J., Barnich, N., and Nguyen, H.T.T. (2016a). Exosomes: From Functions in Host-Pathogen Interactions and Immunity to Diagnostic and Therapeutic Opportunities. In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 39–75.
- Carrière, J., Bretin, A., Darfeuille-Michaud, A., Barnich, N., and Nguyen, H.T.T. (2016b). Exosomes Released from Cells Infected with Crohn’s Disease-associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Activate Host Innate Immune Responses and Enhance Bacterial Intracellular Replication. *Inflamm. Bowel Dis.* 22, 516–528.
- Carvalho, F.A., Barnich, N., Sauvanet, P., Darcha, C., Gelot, A., and Darfeuille-Michaud, A. (2008). Crohn’s disease-associated *Escherichia coli* LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 1051–1060.
- Carvalho, F.A., Barnich, N., Sivignon, A., Darcha, C., Chan, C.H.F., Stanners, C.P., and Darfeuille-Michaud, A. (2009). Crohn’s disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J. Exp. Med.* 206, 2179–2189.
- Cauwel, M., Sivignon, A., Bridot, C., Nongbe, M.C., Deniaud, D., Roubinet, B., Landemarre, L., Felpin, F., Bouckaert, J., Barnich, N., et al. (2019). Heptylmannose-functionalized cellulose for the binding and specific detection of pathogenic *E. coli*. *Chem. Commun.* 55, 10158–10161.
- Chai, Q., Wang, X., Qiang, L., Zhang, Y., Ge, P., Lu, Z., Zhong, Y., Li, B., Wang, J., Zhang, L., et al. (2019). A *Mycobacterium tuberculosis* surface protein recruits ubiquitin to trigger host xenophagy. *Nat. Commun.* 10, 1973.
- Chalopin, T., Alvarez Dorta, D., Sivignon, A., Caudan, M., Dumych, T.I., Bilyy, R.O., Deniaud, D., Barnich, N., Bouckaert, J., and Gouin, S.G. (2016). Second generation of thiazolylmannosides, FimH antagonists for *E. coli*-induced Crohn’s disease. *Org. Biomol. Chem.* 14, 3913–3925.
- Chan, B.D., Wong, W., Lee, M.M., Cho, W.C., Yee, B.K., Kwan, Y.W., and Tai, W.C. (2019). Exosomes in Inflammation and Inflammatory Disease. *Proteomics* 19, 1800149.
- Chan, S.S.M., Luben, R., Bergmann, M.M., Boeing, H., Olsen, A., Tjønneland, A., Overvad, K., Kaaks, R., Kennedy, H., Khaw, K.-T., et al. (2011). Aspirin in the aetiology of Crohn’s disease and ulcerative colitis: a European prospective cohort study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 34, 649–655.
- Chang, S., and Hanauer, S. (2017). Optimizing pharmacologic management of inflammatory bowel disease. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 10, 595–607.
- Chang, C., Chen, C., Chiang, J.Y., Sun, C., Chen, Y., and Chen, K. (2019). Synergistic effect of combined melatonin and adipose-derived mesenchymal stem cell (ADMSC)-derived exosomes on amelioration of dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis. *11*, 2706–2724.
- Chang, Y., Yan, W., He, X., Zhang, L., Li, C., Huang, H., Nace, G., Geller, D.A., Lin, J., and Tsung, A. (2012). miR-375 Inhibits Autophagy and Reduces Viability of Hepatocellular Carcinoma Cells Under Hypoxic Conditions. *Gastroenterology* 143, 177-187.e8.
- Chargui, A., Cesaro, A., Mimouna, S., Fareh, M., Brest, P., Naquet, P., Darfeuille-Michaud, A., Hébuterne, X., Mograbi, B., Vouret-Craviari, V., et al. (2012). Subversion of autophagy in adherent invasive *Escherichia coli*-infected neutrophils induces inflammation and cell death. *PLoS One* 7, e51727.
- Chassaing, B., and Darfeuille-Michaud, A. (2013). The σ^E pathway is involved in biofilm formation by Crohn’s

- disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *195*, 76–84.
- Chassaing, B., Rolhion, N., Vallée, A. De, Salim, S.Y., Prorok-Hamon, M., Neut, C., Campbell, B.J., Söderholm, J.D., Hugot, J., Colombel, J.-F., et al. (2011). 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.
- 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. *Environ. Microbiol.* *15*, 355–371.
- Chassaing, B., Koren, O., Carvalho, F.A., Ley, R.E., and Gewirtz, A.T. (2014). AIEC pathobiont instigates chronic colitis in susceptible hosts by altering microbiota composition. *Gut* *63*, 1069–1080.
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J.K., Poole, A.C., Srinivasan, S., Ley, R.E., and Gewirtz, A.T. (2015a). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* *519*, 92–96.
- Chassaing, B., Garénaux, E., Carriere, J., Rolhion, N., Guérardel, Y., Barnich, N., Bonnet, R., and Darfeuille-Michaud, A. (2015b). Analysis of the σ^E Regulon in Crohn's Disease-Associated *Escherichia coli* Revealed Involvement of the *waaWVL* Operon in Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* *197*, 1451–1465.
- Chatterjee, A., Chattopadhyay, D., and Chakrabarti, G. (2014). miR-17-5p Downregulation Contributes to Paclitaxel Resistance of Lung Cancer Cells through Altering Beclin1 Expression. *PLoS One* *9*, e95716.
- Chauhan, S., Mandell, M.A., and Deretic, V. (2015). IRGM governs the core autophagy machinery to conduct antimicrobial defense. *Mol. Cell* *58*, 507–521.
- Chehoud, C., Albenberg, L.G., Judge, C., Hoffmann, C., Grunberg, S., Bittinger, K., Baldassano, R.N., Lewis, J.D., Bushman, F.D., and Wu, G.D. (2015). Fungal Signature in the Gut Microbiota of Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *21*, 1948–1956.
- Chen, K., and Shi, W. (2016). Autophagy regulates resistance of non-small cell lung cancer cells to paclitaxel. *Tumor Biol.* *37*, 10539–10544.
- Chen, D., Liu, J., Zhao, H.-Y., Chen, Y.-P., Xiang, Z., and Jin, X. (2016). Plasma long noncoding RNA expression profile identified by microarray in patients with Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* *22*, 4716.
- Chen, J.-S., Hu, F., Kugathasan, S., Jorde, L.B., Nix, D., Rutherford, A., Denson, L., Watkins, W.S., Prahalad, S., Huff, C., et al. (2018a). Targeted Gene Sequencing in Children with Crohn's Disease and Their Parents: Implications for Missing Heritability. *G3 (Bethesda)*. *8*, 2881–2888.
- Chen, L., Wang, K., Long, A., Jia, L., Zhang, Y., Deng, H., Li, Y., Han, J., and Wang, Y. (2017). Fasting-induced hormonal regulation of lysosomal function. *Cell Res.* *27*, 748–763.
- Chen, P., Li, Y., Li, L., Yu, Q., Chao, K., Zhou, G., Qiu, Y., Feng, R., Huang, S., He, Y., et al. (2019). Circulating microRNA146b-5p is superior to C-reactive protein as a novel biomarker for monitoring inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *49*, 733–743.
- Chen, W., Li, D., Paulus, B., Wilson, I., and Chadwick, V.S. (2000). Detection of *Listeria monocytogenes* by polymerase chain reaction in intestinal mucosal biopsies from patients with inflammatory bowel disease and controls. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *15*, 1145–1150.
- Chen, Y., Wang, X., Yu, Y., Xiao, Y., Huang, J., Yao, Z., Chen, X., Zhou, T., Li, P., and Xu, C. (2018b). Serum exosomes of chronic gastritis patients infected with *Helicobacter pylori* mediate IL-1 α expression via IL-6 trans-signalling in gastric epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* *194*, 339–349.
- Chen, Z., Wang, T., Liu, Z., Zhang, G., Wang, J., Feng, S., and Liang, J. (2015). Inhibition of Autophagy by MiR-30A Induced by *Mycobacteria tuberculosis* as a Possible Mechanism of Immune Escape in Human Macrophages. *Jpn. J. Infect. Dis.* *68*, 420–424.
- Cheng, X., Zhang, X., Su, J., Zhang, Y., Zhou, W., Zhou, J., Wang, C., Liang, H., Chen, X., Shi, R., et al. (2015a). miR-19b downregulates intestinal SOCS3 to reduce intestinal inflammation in Crohn's disease. *Sci. Rep.* *5*, 10397.
- Cheng, Y., Zhu, Y., Huang, X., Zhang, W., Han, Z., and Liu, S. (2015b). Association between TLR2 and TLR4 Gene Polymorphisms and the Susceptibility to Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *PLoS One* *10*, e0126803.
- Chew, T.S., O'Shea, N.R., Sewell, G.W., Oehlers, S.H., Mulvey, C.M., Crosier, P.S., Godovac-Zimmermann, J., Bloom, S.L., Smith, A.M., and Segal, A.W. (2015). Optineurin deficiency in mice contributes to impaired cytokine secretion and neutrophil recruitment in bacteria-driven colitis. *Dis. Model. Mech.* *8*, 817–829.
- Chiba, M. (2019). Westernized Diet is the Most Ubiquitous Environmental Factor in Inflammatory Bowel Disease. *Perm. J.* *1*–4.
- Chiba, H., Kakuta, Y., Kinouchi, Y., Kawai, Y., Watanabe, K., Nagao, M., Naito, T., Onodera, M., Moroi, R., Kuroha, M., et al. (2018). Allele-specific DNA methylation of disease susceptibility genes in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One* *13*, e0194036.
- Chiba, M., Tsuji, T., Takahashi, K., Komatsu, M., Sugawara, T., and Ono, I. (2016). Onset of Ulcerative Colitis after *Helicobacter pylori* Eradication Therapy: A Case Report. *Perm. J.* *20*, e115-8.
- Chin, E.Y., Dangler, C.A., Fox, J.G., and Schauer, D.B. (2000). *Helicobacter hepaticus* infection triggers inflammatory bowel disease in T cell receptor alpha/beta mutant mice. *Comp. Med.* *50*, 586–594.
- Chiodini, R.J. (1989). Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin. Microbiol. Rev.* *2*, 90–117.
- Chiriaco, M., Bianco, M., Nigro, A., Primiceri, E., Ferrara, F., Romano, A., Quattrini, A., Furlan, R., Arima, V., and Maruccio, G. (2018). Lab-on-Chip for Exosomes and Microvesicles Detection and Characterization. *Sensors* *18*, 3175.
- Cho, J.H. (2008). The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 458–466.
- Cholapranee, A., and Ananthakrishnan, A.N. (2016). Environmental Hygiene and Risk of Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* *22*, 2191–2199.
- Choy, A., Dancourt, J., Mugo, B., O'Connor, T.J., Isberg, R.R., Melia, T.J., and Roy, C.R. (2012). The *Legionella*

- Effector RavZ Inhibits Host Autophagy Through Irreversible Atg8 Deconjugation. *Science* (80-.). 338, 1072–1076.
- Chu, H., Khosravi, A., Kusumawardhani, I.P., Kwon, A.H.K., Vasconcelos, A.C., Cunha, L.D., Mayer, A.E., Shen, Y., Wu, W.-L., Kambal, A., et al. (2016). Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science* (80-.). 352, 1116–1120.
- Chua, A.C.G., Klopčič, B.R.S., Ho, D.S., Fu, S.K., Forrest, C.H., Croft, K.D., Olynyk, J.K., Lawrance, I.C., and Trinder, D. (2013). Dietary Iron Enhances Colonic Inflammation and IL-6/IL-11-Stat3 Signaling Promoting Colonic Tumor Development in Mice. *PLoS One* 8, e78850.
- Chuang, A.Y., Chuang, J.C., Zhai, Z., Wu, F., and Kwon, J.H. (2014). NOD2 Expression is Regulated by microRNAs in Colonic Epithelial HCT116 Cells. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 126–135.
- Chun, Y., and Kim, J. (2018). Autophagy: An Essential Degradation Program for Cellular Homeostasis and Life. *Cells* 7, 278.
- Chuo, S.T.-Y., Chien, J.C.-Y., and Lai, C.P.-K. (2018). Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods. *J. Biomed. Sci.* 25, 91.
- Ciccacci, C., Politi, C., Biancone, L., Latini, A., Novelli, G., Calabrese, E., and Borgiani, P. (2017). Polymorphisms in MIR122, MIR196A2, and MIR124A Genes are Associated with Clinical Phenotypes in Inflammatory Bowel Diseases. *Mol. Diagn. Ther.* 21, 107–114.
- Cieza, R.J., Hu, J., Ross, B.N., Sbrana, E., and Torres, A.G. (2015). The IbeA invasin of adherent-invasive *Escherichia coli* mediates interaction with intestinal epithelia and macrophages. *Infect. Immun.* 83, 1904–1918.
- Clayton, A., Harris, C.L., Court, J., Mason, M.D., and Morgan, B.P. (2003). Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. *Eur. J. Immunol.* 33, 522–531.
- Clayton, A., Al-Taei, S., Webber, J., Mason, M.D., and Tabi, Z. (2011). Cancer Exosomes Express CD39 and CD73, Which Suppress T Cells through Adenosine Production. *J. Immunol.* 187, 676–683.
- Clayton, E.M., Rea, M.C., Shanahan, F., Quigley, E.M.M., Kiely, B., Hill, C., and Ross, R.P. (2009). The vexed relationship between *Clostridium difficile* and inflammatory bowel disease: An assessment of carriage in an outpatient setting among patients in remission. *Am. J. Gastroenterol.* 104, 1162–1169.
- Colino, J., and Snapper, C.M. (2006). Exosomes from Bone Marrow Dendritic Cells Pulsed with Diphtheria Toxoid Preferentially Induce Type 1 Antigen-Specific IgG Responses in Naive Recipients in the Absence of Free Antigen. *J. Immunol.* 177, 3757–3762.
- Colino, J., and Snapper, C.M. (2007). Dendritic cell-derived exosomes express a *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide type 14 cross-reactive antigen that induces protective immunoglobulin responses against pneumococcal infection in mice. *Infect. Immun.* 75, 220–230.
- Collino, F., Deregibus, M.C., Bruno, S., Sterpone, L., Aghemo, G., Viltono, L., Tetta, C., and Camussi, G. (2010). Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One* 5.
- Colman, R.J., and Rubin, D.T. (2014). Fecal microbiota transplantation as therapy for inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *J. Crohn's Colitis* 8, 1569–1581.
- Colombel, J.F., Lémann, M., Cassagnou, M., Bouhnik, Y., Duclos, B., Dupas, J.L., Notteghem, B., and Mary, J.Y. (1999). A controlled trial comparing ciprofloxacin with mesalazine for the treatment of active Crohn's disease. Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives (GETAID). *Am. J. Gastroenterol.* 94, 674–678.
- Comincini, S., Allavena, G., Palumbo, S., Morini, M., Durando, F., Angeletti, F., Pirtoli, L., and Miracco, C. (2013). MicroRNA-17 regulates the expression of ATG7 and modulates the autophagy process, improving the sensitivity to temozolomide and low-dose ionizing radiation treatments in human glioblastoma cells. *Cancer Biol. Ther.* 14, 574–586.
- Console, L., Scalise, M., and Indiveri, C. (2019). Exosomes in inflammation and role as biomarkers. *Clin. Chim. Acta* 488, 165–171.
- Cooke, J., Zhang, H., Greger, L., Silva, A.-L., Massey, D., Dawson, C., Metz, A., Ibrahim, A., and Parkes, M. (2012). Mucosal genome-wide methylation changes in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 2128–2137.
- Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P., Ferguson, D.J.P., Campbell, B.J., Jewell, D., and Simmons, A. (2010). NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat. Med.* 16, 90–97.
- Copetti, T., Bertoli, C., Dalla, E., Demarchi, F., and Schneider, C. (2009). p65/RelA Modulates BECN1 Transcription and Autophagy. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2594–2608.
- Coqueiro, A.Y., Raizel, R., Bonvini, A., Tirapegui, J., and Rogero, M.M. (2019). Probiotics for inflammatory bowel diseases: a promising adjuvant treatment. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 70, 20–29.
- Cosin-Roger, J., Simmen, S., Melhem, H., Atrott, K., Frey-Wagner, I., Hausmann, M., De Vallière, C., Spalinger, M.R., Spielmann, P., Wenger, R.H., et al. (2017). Hypoxia ameliorates intestinal inflammation through NLRP3/mTOR downregulation and autophagy activation. *Nat. Commun.* 8, 1–13.
- Coskun, M., Bjerrum, J.T., Seidelin, J.B., and Nielsen, O.H. (2012). MicroRNAs in inflammatory bowel disease--pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *World J. Gastroenterol.* 18, 4629–4634.
- Cosnes, J. (2004). Tobacco and IBD: Relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18, 481–496.
- Cosnes, J., Bourrier, A., Nion-Larmurier, I., Sokol, H., Beaugerie, L., and Seksik, P. (2012). Factors affecting outcomes in Crohn's disease over 15 years. *Gut* 61, 1140–1145.
- Costanzo, M., Cesi, V., Prete, E., Negroni, A., Palone, F., Cucchiara, S., Oliva, S., Leter, B., and Stronati, L. (2016). Krill oil reduces intestinal inflammation by improving epithelial integrity and impairing adherent-invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *Dig. Liver Dis.* 48, 34–42.
- Cosulich, M.E., Rubartelli, A., Risso, A., Cozzolino, F., and Bargellesi, A. (1987). Functional characterization of an antigen involved in an early step of T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 4205–4209.

- Croese, J. (2006). A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Crohn's patients and reservoir donors. *Gut* 55, 136–137.
- Crohn, B.B., Ginzburg, L., and Oppenheimer, G.D. (1952). Regional ileitis. *Am. J. Med.* 13, 583–590.

D

- D'Haens, G., Baert, F., van Assche, G., Caenepeel, P., Vergauwe, P., Tuynman, H., De Vos, M., van Deventer, S., Stitt, L., Donner, A., et al. (2008). Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet* 371, 660–667.
- Dalmasso, G., Nguyen, H.T.T., Faïs, T., Massier, S., Barnich, N., Delmas, J., and Bonnet, R. (2019). Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Manipulate Host Autophagy by Impairing SUMOylation. *Cells* 8, 35.
- Danoy, P., Pryce, K., Hadler, J., Bradbury, L.A., Farrar, C., Pointon, J., Ward, M., Weisman, M., Reveille, J.D., Wordsworth, B.P., et al. (2010). Association of variants at 1q32 and STAT3 with ankylosing spondylitis suggests genetic overlap with Crohn's disease. *PLoS Genet.* 6, 1–5.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., and Colombel, J.-F. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115, 1405–1413.
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J.-F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127, 412–421.
- Dauer, D.J., Ferraro, B., Song, L., Yu, B., Mora, L., Buettner, R., Enkemann, S., Jove, R., and Haura, E.B. (2005). Stat3 regulates genes common to both wound healing and cancer. *Oncogene* 24, 3397–3408.
- Delmas, J., Gibold, L., Faïs, T., Batista, S., Leremboure, M., Sinel, C., Vazeille, E., Cattoir, V., Buisson, A., Barnich, N., et al. (2019). Metabolic adaptation of adherent-invasive *Escherichia coli* to exposure to bile salts. *Sci. Rep.* 9, 2175.
- Dendrou, C.A., Plagnol, V., Fung, E., Yang, J.H.M., Downes, K., Cooper, J.D., Nutland, S., Coleman, G., Himsforth, M., Hardy, M., et al. (2009). Cell-specific protein phenotypes for the autoimmune locus IL2RA using a genotype-selectable human bioresource. *Nat. Genet.* 41, 1011–1015.
- Denizot, J., Sivignon, A., Barreau, F., Darcha, C., Chan, H.F.C., Stanners, C.P., Hofman, P., Darfeuille-Michaud, A., and Barnich, N. (2012). Adherent-invasive *Escherichia coli* induce claudin-2 expression and barrier defect in CEABAC10 mice and Crohn's disease patients. *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 294–304.
- Denzer, K., van Eijk, M., Kleijmeer, M.J., Jakobson, E., de Groot, C., and J. Geuze, H. (2000). Follicular Dendritic Cells Carry MHC Class II-Expressing Microvesicles at Their Surface. *J. Immunol.* 165, 1259–1265.
- Deretic, V., Saitoh, T., and Akira, S. (2013). Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 722–737.
- Van Deun, J., Mestdagh, P., Sormunen, R., Cocquyt, V., Vermaelen, K., Vandesompele, J., Bracke, M., De Wever, O., and Hendrix, A. (2014). The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *J. Extracell. Vesicles* 3, 1–14.
- Deuring, J.J., Fuhler, G.M., Konstantinov, S.R., Peppelenbosch, M.P., Kuipers, E.J., de Haar, C., and van der Woude, C.J. (2014). Genomic ATG16L1 risk allele-restricted Paneth cell ER stress in quiescent Crohn's disease. *Gut* 63, 1081–1091.
- Diamanti, M.A., Gupta, J., Bennecke, M., De Oliveira, T., Ramakrishnan, M., Braczynski, A.K., Richter, B., Beli, P., Hu, Y., Saleh, M., et al. (2017). IKK α controls ATG16L1 degradation to prevent ER stress during inflammation. *J. Exp. Med.* 214, 423–437.
- Dias, M.V.S., Costa, C.S., and DaSilva, L.L.P. (2018). The Ambiguous Roles of Extracellular Vesicles in HIV Replication and Pathogenesis. *Front. Microbiol.* 9, 1–13.
- Diaz-Gallo, L.M., Espino-Paisán, L., Fransen, K., Gómez-García, M., Van Sommeren, S., Cardena, C., Rodrigo, L., Mendoza, J.L., Taxonera, C., Nieto, A., et al. (2011). Differential association of two PTPN22 coding variants with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 2287–2294.
- Diaz, G., Wolfe, L.M., Kruh-Garcia, N.A., and Dobos, K.M. (2016). Changes in the Membrane-Associated Proteins of Exosomes Released from Human Macrophages after Mycobacterium tuberculosis Infection. *Sci. Rep.* 6, 37975.
- Dogan, B., Fu, J., Zhang, S., Scherl, E.J., and Simpson, K.W. (2018). Rifaximin decreases virulence of Crohn's disease-associated *Escherichia coli* and epithelial inflammatory responses. *J. Antibiot. (Tokyo).* 71, 485–494.
- Dreux, N., Denizot, J., Martinez-Medina, M., Mellmann, A., Billig, M., Kisiela, D., Chattopadhyay, S., Sokurenko, E., Neut, C., Gower-Rousseau, C., et al. (2013). Point Mutations in FimH Adhesin of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Enhance Intestinal Inflammatory Response. *PLoS Pathog.* 9, e1003141.
- Drouet, M., Vignal, C., Singer, E., Djouina, M., Dubreuil, L., Cortot, A., Desreumaux, P., and Neut, C. (2012). AIEC colonization and pathogenicity: Influence of previous antibiotic treatment and preexisting inflammation. *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 1923–1931.
- Duan, X., Zhang, T., Ding, S., Wei, J., Su, C., Liu, H., and Xu, G. (2015). microRNA-17-5p modulates bacille calmette-guerin growth in RAW264.7 cells by targeting ULK1. *PLoS One* 10, 1–12.
- Duerkop, B.A., Kleiner, M., Paez-Espino, D., Zhu, W., Bushnell, B., Hassell, B., Winter, S.E., Kyrpides, N.C., and Hooper, L. V. (2018). Murine colitis reveals a disease-associated bacteriophage community. *Nat. Microbiol.* 3, 1023–1031.
- Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., et al. (2006). A Genome-Wide Association Study Identifies IL23R as an Inflammatory Bowel Disease Gene. *Science* (80-.). 314, 1461–1463.
- Dumortier, J., Lapalus, M.-G., Guillaud, O., Poncet, G., Gagnieu, M.-C., Partensky, C., and Scoazec, J.-Y. (2008). Everolimus for refractory Crohn's disease: a case report. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 874–877.

Dumych, T., Yamakawa, N., Sivignon, A., Garenaux, E., Robakiewicz, S., Coddeville, B., Bongiovanni, A., Bray, F., Barnich, N., Szunerits, S., et al. (2018). Oligomannose-Rich Membranes of Dying Intestinal Epithelial Cells Promote Host Colonization by Adherent-Invasive *E. coli*. *Front. Microbiol.* 9.

Dunlop, E.A., Hunt, D.K., Acosta-Jaquez, H.A., Fingar, D.C., and Tee, A.R. (2011). ULK1 inhibits mTORC1 signaling, promotes multisite Raptor phosphorylation and hinders substrate binding. *Autophagy* 7, 737–747.

Dunn, J.D., and Valdivia, R.H. (2010). Uncivil engineers: Chlamydia, Salmonella and Shigella alter cytoskeleton architecture to invade epithelial cells. *Future Microbiol.* 5, 1219–1232.

Duttagupta, R., DiRienzo, S., Jiang, R., Bowers, J., Gollub, J., Kao, J., Kearney, K., Rudolph, D., Dawany, N.B., Showe, M.K., et al. (2012). Genome-wide maps of circulating miRNA biomarkers for Ulcerative Colitis. *PLoS One* 7.

E

Edwards, S.L., Beesley, J., French, J.D., and Dunning, A.M. (2013). Beyond GWASs: Illuminating the Dark Road from Association to Function. *Am. J. Hum. Genet.* 93, 779–797.

Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., et al. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-Activated Protein Kinase Connects Energy Sensing to Mitophagy. *Science* (80-). 331, 456–461.

Eichenberger, R.M., Ryan, S., Jones, L., Buitrago, G., Polster, R., Montes de Oca, M., Zuvelek, J., Giacomini, P.R., Dent, L.A., Engwerda, C.R., et al. (2018). Hookworm Secreted Extracellular Vesicles Interact With Host Cells and Prevent Inducible Colitis in Mice. *Front. Immunol.* 9, 1–14.

El-Khider, F., and McDonald, C. (2016). Links of Autophagy Dysfunction to Inflammatory Bowel Disease Onset. *Dig. Dis.* 34, 27–34.

Elia, P.P., Tolentino, Y.F.M., Bernardazzi, C., and de Souza, H.S.P. (2015). The Role of Innate Immunity Receptors in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Mediators Inflamm.* 2015, 1–10.

Ellinghaus, D., Zhang, H., Zeissig, S., Lipinski, S., Till, A., Jiang, T., Stade, B., Bromberg, Y., Ellinghaus, E., Keller, A., et al. (2013). Association Between Variants of PRDM1 and NDP52 and Crohn's Disease, Based on Exome Sequencing and Functional Studies. *Gastroenterology* 145, 339–347.

F

Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G.J., et al. (2012). MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E2110–E2116.

Fasseu, M., Tréton, X., Guichard, C., Pedruzzi, E., Cazals-Hatem, D., Richard, C., Aparicio, T., Daniel, F., Soulé, J.-C., Moreau, R., et al. (2010). Identification of Restricted Subsets of Mature microRNA Abnormally Expressed in Inactive Colonic Mucosa of Patients with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One* 5, e13160.

Fazlul Kabir, M., Kim, H.-R., and Chae, H.-J. (2019). Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy. In *Endoplasmic Reticulum*, (IntechOpen), p. 13.

Feng, Y., Yao, Z., and Klionsky, D.J. (2015). How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy. *Trends Cell Biol.* 25, 354–363.

Fernandes, M.A., Verstraete, S.G., Phan, T.G., Deng, X., Stekol, E., LaMere, B., Lynch, S. V., Heyman, M.B., and Delwart, E. (2019). Enteric Virome and Bacterial Microbiota in Children With Ulcerative Colitis and Crohn Disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 68, 30–36.

Fleming, A., Sampey, G., Chung, M.-C., Bailey, C., van Hoek, M.L., Kashanchi, F., and Hakami, R.M. (2014). The carrying pigeons of the cell: exosomes and their role in infectious diseases caused by human pathogens. *Pathog. Dis.* 71, 109–120.

Floch, M.H. (2018). The Role of Prebiotics and Probiotics in Gastrointestinal Disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 47, 179–191.

Forbes, A., Escher, J., Hébuterne, X., Kłęk, S., Krznaric, Z., Schneider, S., Shamir, R., Stadelova, K., Wierdsma, N., Wiskin, A.E., et al. (2017). ESPEN guideline: Clinical nutrition in inflammatory bowel disease. *Clin. Nutr.* 36, 321–347.

Frade-Proud'Hon-Clerc, S., Smol, T., Frenois, F., Sand, O., Vaillant, E., Dhennin, V., Bonnefond, A., Froguel, P., Fumery, M., Guillon-Dellac, N., et al. (2019). A Novel Rare Missense Variation of the NOD2 Gene: Evidences of Implication in Crohn's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 835.

Franco, L.H., Nair, V.R., Scharn, C.R., Xavier, R.J., Torrealba, J.R., Shiloh, M.U., and Levine, B. (2017). The Ubiquitin Ligase Smurf1 Functions in Selective Autophagy of Mycobacterium tuberculosis and Anti-tuberculous Host Defense. *Cell Host Microbe* 21, 59–72.

Frank, D.N., St. Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 13780–13785.

Franke, A., McGovern, D.P.B., Barrett, J.C., Wang, K., Radford-Smith, G.L., Ahmad, T., Lees, C.W., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., et al. (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat. Genet.* 42, 1118–1125.

Franzosa, E.A., Sirota-Madi, A., Avila-Pacheco, J., Fornelos, N., Haiser, H.J., Reinker, S., Vatanen, T., Hall, A.B., Mallick, H., McIver, L.J., et al. (2019). Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. *Nat. Microbiol.* 4, 293–305.

Frioni, A., Conte, M.P., Cutone, A., Longhi, C., Musci, G., di Patti, M.C.B., Natalizi, T., Marazzato, M., Lepanto, M.S., Puddu, P., et al. (2014). Lactoferrin differently modulates the inflammatory response in epithelial models mimicking human inflammatory and infectious diseases. *BioMetals* 27, 843–856.

Frye, B.C., Halfter, S., Djurdjaj, S., Muehlenberg, P., Weber, S., Raffetseder, U., En-Nia, A., Knott, H., Baron, J.M., Dooley, S., et al. (2009). Y-box protein-1 is actively secreted through a non-classical pathway and acts as an extracellular mitogen. *EMBO Rep.* 10, 783–789.

Fulda, S., Gorman, A.M., Hori, O., and Samali, A. (2010). Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *Int. J. Cell Biol.* 2010, 1–23.

G

Gade, P., Ramachandran, G., Maachani, U.B., Rizzo, M.A., Okada, T., Prywes, R., Cross, A.S., Mori, K., and Kalvakolanu, D. V. (2012). An IFN- γ -stimulated ATF6-C/EBP- β -signaling pathway critical for the expression of Death Associated Protein Kinase 1 and induction of autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 10316–10321.

Galluzzi, L., Pietrocola, F., Levine, B., and Kroemer, G. (2014). Metabolic Control of Autophagy. *Cell* 159, 1263–1276.

Galluzzi, L., Baehrecke, E.H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J.M., Cecconi, F., Choi, A.M., Chu, C.T., Codogno, P., Colombo, M.I., et al. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* 36, 1811–1836.

Galtier, M., De Sordi, L., Sivignon, A., de Vallée, A., Maura, D., Neut, C., Rahmouni, O., Wannerberger, K., Darfeuille-Michaud, A., Desreumaux, P., et al. (2017). Bacteriophages targeting adherent invasive *Escherichia coli* strains as a promising new treatment for Crohn's disease. *J. Crohn's Colitis* 11, jiw224.

Ganley, I.G., Lam, D.H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. (2009). ULK1-ATG13-FIP200 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy. *J. Biol. Chem.* 284, 12297–12305.

Ge, Q., Dong, Y., Lin, G., and Cao, Y. (2019). Long Noncoding RNA Antisense Noncoding RNA in the INK4 Locus Correlates With Risk, Severity, Inflammation and Infliximab Efficacy in Crohn's Disease. *Am. J. Med. Sci.* 357, 134–142.

Gearry, R.B., Chb, M.B., Richardson, A., Frampton, C.M.A., Collett, J.A., Burt, M.J., Chapman, B.A., and Barclay, M.L. (2006). High incidence of Crohn's disease in Canterbury, New Zealand: results of an epidemiologic study. *Inflamm. Bowel Dis.* 12, 936–943.

Gecse, K.B., and Vermeire, S. (2018). Differential diagnosis of inflammatory bowel disease: imitations and complications. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 3, 644–653.

Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G.R., and Di Sabatino, A. (2014). Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun. Rev.* 13, 3–10.

Gheldof, N., Leleu, M., Noordermeer, D., Rougemont, J., and Reymond, A. (2012). Detecting Long-Range Chromatin Interactions Using the Chromosome Conformation Capture Sequencing (4C-seq) Method. In *Handbook of Systems Biology*, (Elsevier), pp. 211–225.

Ghorpade, D.S., Sinha, A.Y., Holla, S., Singh, V., and Balaji, K.N. (2013). NOD2-Nitric Oxide-responsive MicroRNA-146a Activates Sonic Hedgehog Signaling to Orchestrate Inflammatory Responses in Murine Model of Inflammatory Bowel Disease. *J. Biol. Chem.* 288, 33037–33048.

Gibbins, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M., and Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat. Cell Biol.* 11, 1143–1149.

Gibold, L., Garenaux, E., Dalmasso, G., Gallucci, C., Cia, D., Mottet-Auselo, B., Faïs, T., Darfeuille-Michaud, A., Nguyen, H.T.T., Barnich, N., et al. (2016). The Vat-AIEC protease promotes crossing of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* 18, 617–631.

Giri, P.K., and Schorey, J.S. (2008). Exosomes derived from *M. bovis* BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in vitro and in vivo. *PLoS One* 3.

Giri, P.K., Kruh, N.A., Dobos, K.M., and Schorey, J.S. (2010). Proteomic analysis identifies highly antigenic proteins in exosomes from *M. tuberculosis*-infected and culture filtrate protein-treated macrophages. *Proteomics* 10, 3190–3202.

Glas, J., Wagner, J., Seiderer, J., Olszak, T., Wetzke, M., Beigel, F., Tillack, C., Stallhofer, J., Friedrich, M., Steib, C., et al. (2012). PTPN2 Gene Variants Are Associated with Susceptibility to Both Crohn's Disease and Ulcerative Colitis Supporting a Common Genetic Disease Background. *PLoS One* 7, e33682.

Glasser, A.L., Boudeau, J., Barnich, N., Perruchot, M.H., Colombel, J.F., and Darfeuille-Michaud, A. (2001). Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect. Immun.* 69, 5529–5537.

Glauben, R., Batra, A., Fedke, I., Zeitz, M., Lehr, H.A., Leoni, F., Mascagni, P., Fantuzzi, G., Dinarello, C.A., and Siegmund, B. (2006). Histone Hyperacetylation Is Associated with Amelioration of Experimental Colitis in Mice. *J. Immunol.* 176, 5015–5022.

Glocker, E.-O., Kotlarz, D., Boztug, K., Gertz, E.M., Schäffer, A.A., Noyan, F., Perro, M., Diestelhorst, J., Allroth, A., Murugan, D., et al. (2009). Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N. Engl. J. Med.* 361, 2033–2045.

Goethel, A., Turpin, W., Rouquier, S., Zanello, G., Robertson, S.J., Streutker, C.J., Philpott, D.J., and Croitoru, K. (2019). Nod2 influences microbial resilience and susceptibility to colitis following antibiotic exposure. *Mucosal Immunol.* 12, 720–732.

Goldberg, A.A., Nkengfac, B., Sanchez, A.M.J., Moroz, N., Qureshi, S.T., Koromilas, A.E., Wang, S., Burelle, Y., Hussain, S.N., and Kristof, A.S. (2017). Regulation of ULK1 Expression and Autophagy by STAT1. *J. Biol. Chem.* 292, 1899–1909.

Gong, Z., Zhao, S., Zhou, J., Yan, J., Wang, L., Du, X., Li, H., Chen, Y., Cai, W., and Wu, J. (2018). Curcumin

alleviates DSS-induced colitis via inhibiting NLRP3 inflammsome activation and IL-1 β production. *Mol. Immunol.* *104*, 11–19.

González-polo, R.A., Pizarro-estrella, E., Yakhine-diop, S.M.S., Rodríguez-arribas, M., Gómez-sánchez, R., Casadonaranjo, I., Pedro, J.M.B., and Fuentes, J.M. (2016). *Autophagy Networks in Inflammation* (Cham: Springer International Publishing).

Gordon, H., Trier Moller, F., Andersen, V., and Harbord, M. (2015). Heritability in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *21*, 1.

Govani, S.M., Higgins, P.D.R., Stidham, R.W., Montain, S.J., and Waljee, A.K. (2015). Increased Ultraviolet Light Exposure is Associated With Reduced Risk of Inpatient Surgery Among Patients With Crohn's Disease. *J. Crohn's Colitis* *9*, 77–81.

Gradzka, S., Thomas, O.S., Kretz, O., Haimovici, A., Vasilikos, L., Wong, W.W.-L., Häcker, G., and Gentle, I.E. (2018). Inhibitor of apoptosis proteins are required for effective fusion of autophagosomes with lysosomes. *Cell Death Dis.* *9*, 529.

Greening, D.W., Gopal, S.K., Xu, R., Simpson, R.J., and Chen, W. (2015). Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* *40*, 72–81.

Greening, D.W., Xu, R., Gopal, S.K., Rai, A., and Simpson, R.J. (2017). Proteomic insights into extracellular vesicle biology – defining exosomes and shed microvesicles. *Expert Rev. Proteomics* *14*, 69–95.

Greenstein, R.J. (2003). Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet Infect. Dis.* *3*, 507–514.

Guerry, P. (2007). *Campylobacter flagella: not just for motility.* *Trends Microbiol.* *15*, 456–461.

Guo, J., Yang, Z., Yang, X., Li, T., Liu, M., and Tang, H. (2018a). miR-346 functions as a pro-survival factor under ER stress by activating mitophagy. *Cancer Lett.* *413*, 69–81.

Guo, L., Zhao, J., Qu, Y., Yin, R., Gao, Q., Ding, S., Zhang, Y., Wei, J., and Xu, G. (2016). microRNA-20a Inhibits Autophagic Process by Targeting ATG7 and ATG16L1 and Favors Mycobacterial Survival in Macrophage Cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *6*, 1–12.

Guo, L., Wei, J., Xu, G., Zhou, L., Gao, Q., Zhang, A., Hong, D., Chu, Y., Duan, X., and Zhang, Y. (2017). MicroRNA-144-3p inhibits autophagy activation and enhances *Bacillus Calmette-Guérin* infection by targeting ATG4a in RAW264.7 macrophage cells. *PLoS One* *12*, 1–17.

Guo, W., Sun, Y., Liu, W., Wu, X., Guo, L., Cai, P., Wu, X., Wu, X., Shen, Y., Shu, Y., et al. (2014). Small molecule-driven mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome inhibition is responsible for the prevention of colitis-associated cancer. *Autophagy* *10*, 972–985.

Guo, Z., Wu, R., Gong, J., Zhu, W., Li, Y., Wang, Z., Li, N., and Li, J. (2015). Altered microRNA expression in inflamed and non-inflamed terminal ileal mucosa of adult patients with active Crohn's disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *30*, 109–116.

Guo, Z., Cai, X., Guo, X., Xu, Y., Gong, J., Li, Y., and Zhu, W. (2018b). Let-7b ameliorates Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* induced intestinal inflammation via modulating Toll-Like Receptor 4 expression in intestinal epithelial cells. *Biochem. Pharmacol.* *156*, 196–203.

Gurunathan, S., Kang, M.-H., Jeyaraj, M., Qasim, M., and Kim, J.-H. (2019). Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells* *8*, 307.

Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol. Cell* *30*, 214–226.

H

Haberman, Y., BenShoshan, M., Di Segni, A., Dexheimer, P.J., Braun, T., Weiss, B., Walters, T.D., Baldassano, R.N., Noe, J.D., Markowitz, J., et al. (2018). Long ncRNA Landscape in the Ileum of Treatment-Naive Early-Onset Crohn Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *24*, 346–360.

Hagiwara, K., Katsuda, T., Gailhouse, L., Kosaka, N., and Ochiya, T. (2015). Commitment of Annexin A2 in recruitment of microRNAs into extracellular vesicles. *FEBS Lett.* *589*, 4071–4078.

Halfvarson, J., Bodin, L., Tysk, C., Lindberg, E., and Järnerot, G. (2003). Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* *124*, 1767–1773.

Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F.M., Briggs, J., et al. (2007). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat. Genet.* *39*, 207–211.

Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., and Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J. Biol. Chem.* *282*, 37298–37302.

Haney, M.J., Zhao, Y., Harrison, E.B., Mahajan, V., Ahmed, S., He, Z., Suresh, P., Hingtgen, S.D., Klyachko, N.L., Mosley, R.L., et al. (2013). Specific Transfection of Inflamed Brain by Macrophages: A New Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases. *PLoS One* *8*.

Hansen, M., Rubinsztein, D.C., and Walker, D.W. (2018). Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *19*, 579–593.

Haraszti, R.A., Didiot, M.-C., Sapp, E., Leszyk, J., Shaffer, S.A., Rockwell, H.E., Gao, F., Narain, N.R., DiFiglia, M., Kiebish, M.A., et al. (2016). High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J. Extracell. Vesicles* *5*, 32570.

Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* *97*, 329–339.

Hartjes, T., Mytnyk, S., Jenster, G., van Steijn, V., and van Royen, M. (2019). Extracellular Vesicle Quantification and Characterization: Common Methods and Emerging Approaches. *Bioengineering* 6, 7.

Häsler, R., Sheibani-Tezerji, R., Sinha, A., Barann, M., Rehman, A., Esser, D., Aden, K., Knecht, C., Brandt, B., Nikolaus, S., et al. (2017). Uncoupling of mucosal gene regulation, mRNA splicing and adherent microbiota signatures in inflammatory bowel disease. *Gut* 66, 2087–2097.

He, C., Shi, Y., Wu, R., Sun, M., Fang, L., Wu, W., Liu, C., Tang, M., Li, Z., Wang, P., et al. (2016). MIR-301a promotes intestinal mucosal inflammation through induction of IL-17A and TNF- α in IBD. *Gut* 65, 1938–1950.

He, J., Yu, J.-J., Xu, Q., Wang, L., Zheng, J.Z., Liu, L.-Z., and Jiang, B.-H. (2015). Downregulation of ATG14 by EGR1-MIR152 sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis by inhibiting cyto-protective autophagy. *Autophagy* 11, 373–384.

Heath, R.J., Goel, G., Baxt, L.A., Rush, J.S., Mohanan, V., Paulus, G.L.C., Jani, V., Lassen, K.G., and Xavier, R.J. (2016). RNF166 Determines Recruitment of Adaptor Proteins during Antibacterial Autophagy. *Cell Rep.* 17, 2183–2194.

Hedin, C., van der Gast, C.J., Rogers, G.B., Cuthbertson, L., McCartney, S., Stagg, A.J., Lindsay, J.O., and Whelan, K. (2016). Siblings of patients with Crohn’s disease exhibit a biologically relevant dysbiosis in mucosal microbial metacommunities. *Gut* 65, 944–953.

Henckaerts, L., Cleyne, I., Brinar, M., John, J.M., Van Steen, K., Rutgeerts, P., and Vermeire, S. (2011). Genetic variation in the autophagy gene ULK1 and risk of Crohn’s disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 1392–1397.

Henderson, P., Wilson, D.C., Satsangi, J., and Stevens, C. (2012). A role for vimentin in Crohn disease. *Autophagy* 8, 1695–1696.

Herrera, M.B., Fonsato, V., Gatti, S., Deregibus, M.C., Sordi, A., Cantarella, D., Calogero, R., Bussolati, B., Tetta, C., and Camussi, G. (2009). Human liver stem cell-derived microvesicles accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 1605–1618.

Hessvik, N.P., and Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 193–208.

Hessvik, N.P., Øverbye, A., Brech, A., Torgersen, M.L., Jakobsen, I.S., Sandvig, K., and Llorente, A. (2016). PIKfyve inhibition increases exosome release and induces secretory autophagy. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 4717–4737.

Hetz, C., Thielen, P., Matus, S., Nassif, M., Court, F., Kiffin, R., Martinez, G., Cuervo, A.M., Brown, R.H., and Glimcher, L.H. (2009). XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev.* 23, 2294–2306.

Hoarau, G., Mukherjee, P.K., Gower-Rousseau, C., Hager, C., Chandra, J., Retuerto, M.A., Neut, C., Vermeire, S., Clemente, J., Colombel, J.F., et al. (2016). Bacteriome and Mycobioime Interactions Underscore Microbial Dysbiosis in Familial Crohn’s Disease. *MBio* 7, 1–11.

Homewood, R., Gibbons, C., Richards, D., Lewis, A., Duane, P., and Griffiths, A. (2003). Ileitis due to *Yersinia pseudotuberculosis* in Crohn’s disease. *J. Infect.* 47, 328–332.

Hong, S.N., Joung, J.G., Bae, J.S., Lee, C.S., Koo, J.S., Park, S.J., Im, J.P., Kim, Y.S., Kim, J.W., Park, W.Y., et al. (2017). RNA-seq Reveals Transcriptomic Differences in Inflamed and Noninflamed Intestinal Mucosa of Crohn’s Disease Patients Compared with Normal Mucosa of Healthy Controls. *Inflamm. Bowel Dis.* 23, 1098–1108.

Hooper, K.M., Casanova, V., Kemp, S., Staines, K.A., Satsangi, J., Barlow, P.G., Henderson, P., and Stevens, C. (2019). The Inflammatory Bowel Disease Drug Azathioprine Induces Autophagy via mTORC1 and the Unfolded Protein Response Sensor PERK. *Inflamm. Bowel Dis.* XX, 1–16.

Horibe, S., Tanahashi, T., Kawauchi, S., Murakami, Y., and Rikitake, Y. (2018). Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake. *BMC Cancer* 18, 1–9.

Horstman, A.L., and Kuehn, M.J. (2002). Bacterial Surface Association of Heat-labile Enterotoxin through Lipopolysaccharide after Secretion via the General Secretory Pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 32538–32545.

Hou, J.K., Abraham, B., and El-Serag, H. (2011). Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: A systematic review of the literature. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 563–573.

Howell, K.J., Kraiczy, J., Nayak, K.M., Gaspardo, M., Ross, A., Lee, C., Mak, T.N., Koo, B.-K., Kumar, N., Lawley, T., et al. (2018). DNA Methylation and Transcription Patterns in Intestinal Epithelial Cells From Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Diseases Differentiate Disease Subtypes and Associate With Outcome. *Gastroenterology* 154, 585–598.

Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., et al. (2007). Control of Macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase- β , and Bcl-2. *Mol. Cell* 25, 193–205.

Huang, J., and Brumell, J.H. (2014). Bacteria–autophagy interplay: a battle for survival. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 101–114.

Huang, Y., and Chen, Z. (2016). Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity. *Am. J. Transl. Res.* 8, 2490–2497.

Huang, F., Bai, J., Zhang, J., Yang, D., Fan, H., Huang, L., Shi, T., and Lu, G. (2019). Identification of potential diagnostic biomarkers for pneumonia caused by adenovirus infection in children by screening serum exosomal microRNAs. *Mol. Med. Rep.* 49, 4306–4314.

Huang, R., Xu, Y., Wan, W., Shou, X., Qian, J., You, Z., Liu, B., Chang, C., Zhou, T., Lippincott-Schwartz, J., et al. (2015). Deacetylation of Nuclear LC3 Drives Autophagy Initiation under Starvation. *Mol. Cell* 57, 456–466.

Huang, Y., Chuang, A.Y., and Ratovitski, E.A. (2011). Phospho- Δ Np63 α /miR-885-3p axis in tumor cell life and cell death upon cisplatin exposure. *Cell Cycle* 10, 3938–3947.

Huang, Y., Guerrero-Preston, R., and Ratovitski, E.A. (2012). Phospho- Δ Np63 α -dependent regulation of autophagic signaling through transcription and micro-RNA modulation. *Cell Cycle* 11, 1247–1259.

Huangfu, L., Liang, H., Wang, G., Su, X., Li, L., Du, Z., Hu, M., Dong, Y., Bai, X., Liu, T., et al. (2016). miR-183 regulates autophagy and apoptosis in colorectal cancer through targeting of UVRAG. *Oncotarget* 7.

Huett, A., Heath, R.J., Begun, J., Sassi, S.O., Baxt, L.A., Vyas, J.M., Goldberg, M.B., and Xavier, R.J. (2012). The LRR and RING Domain Protein LRSAM1 Is an E3 Ligase Crucial for Ubiquitin-Dependent Autophagy of Intracellular Salmonella Typhimurium. *Cell Host Microbe* 12, 778–790.

Hugot, J.-P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.-P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O’Morain, C.A., Gassull, M., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature* 411, 599–603.

Hugot, J.-P., Alberti, C., Berrebi, D., Bingen, E., and Cézard, J.-P. (2003). Crohn’s disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* 362, 2012–2015.

Hugot, J.-P., Zaccaria, I., Cavanaugh, J., Yang, H., Vermeire, S., Lappalainen, M., Schreiber, S., Annese, V., Jewell, D.P., Fowler, E. V., et al. (2007). Prevalence of CARD15/NOD2 Mutations in Caucasian Healthy People. *Am. J. Gastroenterol.* 102, 1259–1267.

I

Iborra, M., Bernuzzi, F., Correale, C., Vetrano, S., Fiorino, G., Beltrán, B., Marabita, F., Locati, M., Spinelli, A., Nos, P., et al. (2013). Identification of serum and tissue micro-RNA expression profiles in different stages of inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* 173, 250–258.

Iida, T., Yokoyama, Y., Wagatsuma, K., Hirayama, D., and Nakase, H. (2018). Impact of Autophagy of Innate Immune Cells on Inflammatory Bowel Disease. *Cells* 8, 7.

Inhann, F., Vich Vila, A., Bonder, M.J., Fu, J., Gevers, D., Visschedijk, M.C., Spekhorst, L.M., Alberts, R., Franke, L., van Dullemen, H.M., et al. (2018). Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease. *Gut* 67, 108–119.

Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell* 115, 577–590.

J

Jan, A.T. (2017). Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. *Front. Microbiol.* 8, 1–11.

Jawhara, S., and Poulain, D. (2007). *Saccharomyces boulardii* decreases inflammation and intestinal colonization by *Candida albicans* in a mouse model of chemically-induced colitis. *Med. Mycol.* 45, 691–700.

Jensen, M.D., Andersen, R.F., Christensen, H., Nathan, T., Kjeldsen, J., and Madsen, J.S. (2015). Circulating microRNAs as biomarkers of adult Crohn’s disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 27, 1038–1044.

Jergens, A.E., Wilson-Welder, J.H., Dorn, A., Henderson, A., Liu, Z., Evans, R.B., Hostetter, J., and Wannemuehler, M.J. (2007). *Helicobacter bilis* triggers persistent immune reactivity to antigens derived from the commensal bacteria in gnotobiotic C3H/HeN mice. *Gut* 56, 934–940.

Jia, G., Cheng, G., Gangahar, D.M., and Agrawal, D.K. (2006). Insulin-like growth factor-1 and TNF- α regulate autophagy through c-jun N-terminal kinase and Akt pathways in human atherosclerotic vascular smooth cells. *Immunol. Cell Biol.* 84, 448–454.

Jiang, K., Yang, J., Guo, S., Zhao, G., Wu, H., and Deng, G. (2019). Peripheral Circulating Exosome-Mediated Delivery of miR-155 as a Novel Mechanism for Acute Lung Inflammation. *Mol. Ther.* 27, 1–14.

Jiang, L., Shen, Y., Guo, D., Yang, D., Liu, J., Fei, X., Yang, Y., Zhang, B., Lin, Z., Yang, F., et al. (2016). EpCAM-dependent extracellular vesicles from intestinal epithelial cells maintain intestinal tract immune balance. *Nat. Commun.* 7, 13045.

Jiao, H., Su, G.-Q., Dong, W., Zhang, L., Xie, W., Yao, L., Chen, P., Wang, Z.-X., Liou, Y.-C., and You, H. (2015). Chaperone-like protein p32 regulates ULK1 stability and autophagy. *Cell Death Differ.* 22, 1812–1823.

Joffe, L.S., Nimrichter, L., Rodrigues, M.L., and Del Poeta, M. (2016). Potential Roles of Fungal Extracellular Vesicles during Infection. *MSphere* 1, 11–14.

John Clotaire, D.Z., Zhang, B., Wei, N., Gao, R., Zhao, F., Wang, Y., Lei, M., and Huang, W. (2016). MiR-26b inhibits autophagy by targeting ULK2 in prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 472, 194–200.

Johnstone, R.M. (1992). Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins. *Biochem. Cell Biol.* 70, 179–190.

Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., and Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 262, 9412–9420.

de Jong, O.G., Verhaar, M.C., Chen, Y., Vader, P., Gremmels, H., Posthuma, G., Schiffelers, R.M., Gucek, M., and van Balkom, B.W.M. (2012). Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *J. Extracell. Vesicles* 1, 18396.

Jovanovic, I.R., Milosavjevic, T.N., Jankovic, G.P., Micev, M.M., Dugalic, P.D., Saranovic, D., Ugljesic, M.M., Popovic, D. V., and Bulajic, M.M. (2001). Clinical onset of the Crohn’s disease after eradication therapy of *Helicobacter pylori* infection. Does *Helicobacter pylori* infection interact with natural history of inflammatory bowel diseases? *Med. Sci. Monit.* 7, 137–141.

Ju, S., Mu, J., Dokland, T., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., Xiang, X., Deng, Z. Bin, Wang, B., Zhang, L., et al. (2013). Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis. *Mol. Ther.* 21, 1345–1357.

Jung, C.H., Seo, M., Otto, N.M., and Kim, D.-H. (2011). ULK1 inhibits the kinase activity of mTORC1 and cell

K

- Kaakoush, N.O., Castano-Rodriguez, N., Day, A.S., Lemberg, D.A., Leach, S.T., and Mitchell, H.M. (2014). *Campylobacter concisus* and exotoxin 9 levels in paediatric patients with Crohn's disease and their association with the intestinal microbiota. *J. Med. Microbiol.* 63, 99–105.
- Kabat, A.M., Harrison, O.J., Riffelmacher, T., Moghaddam, A.E., Pearson, C.F., Laing, A., Abeler-Dörner, L., Forman, S.P., Grecis, R.K., Sattentau, Q., et al. (2016). The autophagy gene Atg16l1 differentially regulates Treg and TH2 cells to control intestinal inflammation. *Elife* 5, 1–27.
- Kabeya, Y. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720–5728.
- Kajimoto, T., Okada, T., Miya, S., Zhang, L., and Nakamura, S. (2013). Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nat. Commun.* 4, 2712.
- Kang, Y.-A., Sanalkumar, R., O'Geen, H., Linnemann, A.K., Chang, C.-J., Bouhassira, E.E., Farnham, P.J., Keles, S., and Bresnick, E.H. (2012). Autophagy Driven by a Master Regulator of Hematopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* 32, 226–239.
- Kaplan, G.G., Jackson, T., Sands, B.E., Frisch, M., Andersson, R.E., and Korzenik, J. (2008). The Risk of Developing Crohn's Disease After an Appendectomy: A Meta-Analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 2925–2931.
- Kaplan, G.G., Hubbard, J., Korzenik, J., Sands, B.E., Panaccione, R., Ghosh, S., Wheeler, A.J., and Villeneuve, P.J. (2010). The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: A novel association. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 2412–2419.
- Karanasios, E., Stapleton, E., Manifava, M., Kaizuka, T., Mizushima, N., Walker, S.A., and Ktistakis, N.T. (2013). Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J. Cell Sci.* 126, 5224–5238.
- Kaser, A., Lee, A.-H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E.S., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., et al. (2008). XBP1 Links ER Stress to Intestinal Inflammation and Confers Genetic Risk for Human Inflammatory Bowel Disease. *Cell* 134, 743–756.
- Keerthikumar, S., Chisanga, D., Ariyaratne, D., Al Saffar, H., Anand, S., Zhao, K., Samuel, M., Pathan, M., Jois, M., Chilamkurti, N., et al. (2016). ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J. Mol. Biol.* 428, 688–692.
- Keita, Å. V., Lindqvist, C.M., Öst, Å., Magana, C.D.L., Schoultz, I., and Halfvarson, J. (2018). Gut Barrier Dysfunction—A Primary Defect in Twins with Crohn's Disease Predominantly Caused by Genetic Predisposition. *J. Crohn's Colitis* 12, 1200–1209.
- Keita, Å. V., Alkaissi, L.Y., Holm, E.B., Heil, S.D.S., Chassaing, B., Darfeuille-Michaud, A., McKay, D.M., and Söderholm, J.D. (2019). Enhanced *E. coli* LF82 translocation through follicle-associated epithelium in Crohn's disease is dependent on long polar fimbriae and CEACAM6-expression, and increases paracellular permeability. *J. Crohn's Colitis*.
- Kennedy, N.A., Lamb, C.A., Berry, S.H., Walker, A.W., Mansfield, J., Parkes, M., Simpkins, R., Tremelling, M., Nutland, S., Parkhill, J., et al. (2018). The Impact of NOD2 Variants on Fecal Microbiota in Crohn's Disease and Controls Without Gastrointestinal Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 24, 583–592.
- Kennedy, N.A., Jones, G.-R., Plevris, N., Patenden, R., Arnott, I.D., and Lees, C.W. (2019). Association Between Level of Fecal Calprotectin and Progression of Crohn's Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*
- Kenzelmann Broz, D., Spano Mello, S., Biegging, K.T., Jiang, D., Dusek, R.L., Brady, C.A., Sidow, A., and Attardi, L.D. (2013). Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses. *Genes Dev.* 27, 1016–1031.
- Khalili, H. (2016). Risk of Inflammatory Bowel Disease with Oral Contraceptives and Menopausal Hormone Therapy: Current Evidence and Future Directions. *Drug Saf.* 39, 193–197.
- Khalyfa, A., Kheirandish-Gozal, L., Khalyfa, A.A., Philby, M.F., Alonso-Alvarez, M.L., Mohammadi, M., Bhattacharjee, R., Teran-Santos, J., Huang, L., Andrade, J., et al. (2016). Circulating plasma extracellular microvesicle MicroRNA cargo and endothelial dysfunction in children with obstructive sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 194, 1116–1126.
- Khan, R.R., Lawson, A.D., Minnich, L.L., Martin, K., Nasir, A., Emmett, M.K., Welch, C.A., and Udall, J.N. (2009). Gastrointestinal Norovirus Infection Associated With Exacerbation of Inflammatory Bowel Disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 48, 328–333.
- Khor, B., Conway, K.L., Omar, A.S., Biton, M., Haber, A.L., Rogel, N., Baxt, L.A., Begun, J., Kuballa, P., Gagnon, J.D., et al. (2019). Distinct Tissue-Specific Roles for the Disease-Associated Autophagy Genes ATG16L2 and ATG16L1. *J. Immunol.* j11800419.
- Kim, B.-W., Kwon, D.H., and Song, H.K. (2016). Structure biology of selective autophagy receptors. *BMB Rep.* 49, 73–80.
- Kim, D.-K., Kang, B., Kim, O.Y., Choi, D., Lee, J., Kim, S.R., Go, G., Yoon, Y.J., Kim, J.H., Jang, S.C., et al. (2013a). EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 2, 20384.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011a). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13, 132–141.
- Kim, J., Kim, Y.C., Fang, C., Russell, R.C., Kim, J.H., Fan, W., Liu, R., Zhong, Q., and Guan, K.-L. (2013b). Differential Regulation of Distinct Vps34 Complexes by AMPK in Nutrient Stress and Autophagy. *Cell* 152, 290–303.
- Kim, J.K., Yuk, J.-M., Kim, S.Y., Kim, T.S., Jin, H.S., Yang, C.-S., and Jo, E.-K. (2015). MicroRNA-125a Inhibits Autophagy Activation and Antimicrobial Responses during Mycobacterial Infection. *J. Immunol.* 194, 5355–5365.
- Kim, J.K., Lee, H.-M., Park, K.-S., Shin, D.-M., Kim, T.S., Kim, Y.S., Suh, H.-W., Kim, S.Y., Kim, I.S., Kim, J.-

M., et al. (2017a). MIR144 * inhibits antimicrobial responses against *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes and macrophages by targeting the autophagy protein DRAM2. *Autophagy* *13*, 423–441.

Kim, K.M., Abdelmohsen, K., Mustapic, M., Kapogiannis, D., and Gorospe, M. (2017b). RNA in extracellular vesicles. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *8*, e1413.

Kim, S.W., Kim, E.S., Moon, C.M., Park, J.J., Kim, T.I., Kim, W.H., and Cheon, J.H. (2011b). Genetic polymorphisms of IL-23R and IL-17A and novel insights into their associations with inflammatory bowel disease. *Gut* *60*, 1527–1536.

Kirkin, V. (2019). History of the Selective Autophagy Research: How Did It Begin and Where Does It Stand Today? *J. Mol. Biol.*

Kisand, K., Bøe Wolff, A.S., Podkrajšek, K.T., Tserel, L., Link, M., Kisand, K. V., Ersvaer, E., Perheentupa, J., Erichsen, M.M., Bratanic, N., et al. (2010). Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J. Exp. Med.* *207*, 299–308.

Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Arozena, A.A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* *12*, 1–222.

Knights, D., Silverberg, M.S., Weersma, R.K., Gevers, D., Dijkstra, G., Huang, H., Tyler, A.D., van Sommeren, S., Imhann, F., Stempak, J.M., et al. (2014). Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease. *Genome Med.* *6*, 107.

Knorr, R.L., Lipowsky, R., and Dimova, R. (2015). Autophagosome closure requires membrane scission. *Autophagy* *11*, 2134–2137.

Ko, Y. (2014). Epidemiological studies of migration and environmental risk factors in the inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* *20*, 1238.

Kobayashi, K.S., Chamillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nuñez, G., and Flavell, R.A. (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* *307*, 731–734.

Kohlhaas, S., Garden, O.A., Scudamore, C., Turner, M., Okkenhaug, K., and Vigorito, E. (2009). Cutting Edge: The Foxp3 Target miR-155 Contributes to the Development of Regulatory T Cells. *J. Immunol.* *182*, 2578–2582.

Kojima, R., Bojar, D., Rizzi, G., Hamri, G.C.-E., El-Baba, M.D., Saxena, P., Ausländer, S., Tan, K.R., and Fussenegger, M. (2018). Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment. *Nat. Commun.* *9*, 1305.

Kökten, T., Gibot, S., Lepage, P., D'Alessio, S., Hablot, J., Ndiaye, N.-C., Busby-Venner, H., Monot, C., Garnier, B., Moulin, D., et al. (2018). TREM-1 Inhibition Restores Impaired Autophagy Activity and Reduces Colitis in Mice. *J. Crohns. Colitis* *12*, 230–244.

Koloski, N.A., Bret, L., and Radford-Smith, G. (2008). Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: A critical review of the literature. *World J. Gastroenterol.* *14*, 165–173.

Koppers-Lalic, D., Hackenberg, M., Bijnsdorp, I. V., van Eijndhoven, M.A.J., Sadek, P., Sie, D., Zini, N., Middeldorp, J.M., Ylstra, B., de Menezes, R.X., et al. (2014). Nontemplated Nucleotide Additions Distinguish the Small RNA Composition in Cells from Exosomes. *Cell Rep.* *8*, 1649–1658.

Korkmaz, G., le Sage, C., Tekirdag, K.A., Agami, R., and Gozuacik, D. (2012). miR-376b controls starvation and mTOR inhibition-related autophagy by targeting ATG4C and BECN1. *Autophagy* *8*, 165–176.

Kossinova, O.A., Gopanenko, A. V., Tamkovich, S.N., Krasheninina, O.A., Tupikin, A.E., Kiseleva, E., Yanshina, D.D., Malygin, A.A., Ven'yaminova, A.G., Kabilov, M.R., et al. (2017). Cytosolic YB-1 and NSUN2 are the only proteins recognizing specific motifs present in mRNAs enriched in exosomes. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* *1865*, 664–673.

Koukos, G., Polytrachou, C., Kaplan, J.L., Oikonomopoulos, A., Ziring, D., Hommes, D.W., Wahed, R., Kokkotou, E., Pothoulakis, C., Winter, H.S., et al. (2015). A MicroRNA Signature in Pediatric Ulcerative Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* *21*, 996–1005.

Kourembanas, S. (2015). Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy. *Annu. Rev. Physiol.* *77*, 13–27.

Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., and Momoi, T. (2007). ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* *14*, 230–239.

Koyama-Honda, I., Itakura, E., Fujiwara, T.K., and Mizushima, N. (2013). Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy* *9*, 1491–1499.

Kreibich, S., Emmenlauer, M., Fredlund, J., Rämö, P., Münz, C., Dehio, C., Enninga, J., and Hardt, W.D. (2015). Autophagy proteins promote repair of endosomal membranes damaged by the Salmonella type three secretion system 1. *Cell Host Microbe* *18*, 527–537.

Krissansen, G.W., Yang, Y., McQueen, F.M., Leung, E., Peek, D., Chan, Y.C., Print, C., Dalbeth, N., Williams, M., and Fraser, A.G. (2015). Overexpression of miR-595 and miR-1246 in the Sera of Patients with Active Forms of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *21*, 520–530.

Kronman, M.P., Zaoutis, T.E., Haynes, K., Feng, R., and Coffin, S.E. (2012). Antibiotic Exposure and IBD Development Among Children: A Population-Based Cohort Study. *Pediatrics* *130*, e794–e803.

Kruh-Garcia, N.A., Wolfe, L.M., Chaisson, L.H., Wordoria, W.O., Nahid, P., Schorey, J.S., Davis, J.L., and Dobos, K.M. (2014). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* peptides in the exosomes of patients with active and latent *M. tuberculosis* infection using MRM-MS. *PLoS One* *9*, 1–11.

Van Kruiningen, H.J., Poulin, M., Garmendia, A.E., Desreumaux, P., Colombel, J.F., De Hertogh, G., Geboes, K., Vermeire, S., and Tsongalis, G.J. (2007). Search for evidence of recurring or persistent viruses in Crohn's disease. *Apmis* *115*, 962–968.

- Kruzel, M.L., Zimecki, M., and Actor, J.K. (2017). Lactoferrin in a Context of Inflammation-Induced Pathology. *Front. Immunol.* 8.
- Ktistakis, N.T., Andrews, S., and Long, J. (2011). What is the advantage of a transient precursor in autophagosome biogenesis? *Autophagy* 7, 118–122.
- Kuate, S., Cinatl, J., Doerr, H.W., and Überla, K. (2007). Exosomal vaccines containing the S protein of the SARS coronavirus induce high levels of neutralizing antibodies. *Virology* 362, 26–37.
- Kubori, T., Bui, X.T., Hubber, A., and Nagai, H. (2017). Legionella RavZ plays a role in preventing ubiquitin recruitment to bacteria-containing vacuoles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 1–9.
- Kumar, G., Shankar, H., Bisht, D., Sharma, P., Singhal, N., Katoch, V.M., and Joshi, B. (2010). A simple and rapid method of sample preparation from culture filtrate of *M. tuberculosis* for two-dimensional gel electrophoresis. *Brazilian J. Microbiol.* 41, 295–299.
- Kunadt, M., Eckermann, K., Stüendl, A., Gong, J., Russo, B., Strauss, K., Rai, S., Kügler, S., Falomir Lockhart, L., Schwalbe, M., et al. (2015). Extracellular vesicle sorting of α -Synuclein is regulated by sumoylation. *Acta Neuropathol.* 129, 695–713.
- Kyo, K., Muto, T., Nagawa, H., Lathrop, G.M., and Nakamura, Y. (2001). Associations of distinct variants of the intestinal mucin gene MUC3A with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J. Hum. Genet.* 46, 5–20.
- Kyriakidi, K. (2016). Neutrophil anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody proteins: bactericidal increasing protein, lactoferrin, cathepsin, and elastase as serological markers of inflammatory bowel and other diseases. *Ann. Gastroenterol.* 29, 258–267.

L

- Lamas, B., Richard, M.L., Leducq, V., Pham, H.-P., Michel, M.-L., Da Costa, G., Bridonneau, C., Jegou, S., Hoffmann, T.W., Natividad, J.M., et al. (2016). CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat. Med.* 22, 598–605.
- Landy, J., Ronde, E., English, N., Clark, S.K., Hart, A.L., Knight, S.C., Ciclitira, P.J., and Al-Hassi, H.O. (2016). Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 22, 3117–3126.
- de Lange, K.M., Moutsianas, L., Lee, J.C., Lamb, C.A., Luo, Y., Kennedy, N.A., Jostins, L., Rice, D.L., Gutierrez-Achury, J., Ji, S.-G., et al. (2017). Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. *Nat. Genet.* 49, 256–261.
- Lapaquette, P., Glasser, A.-L., Huett, A., Xavier, R.J., and Darfeuille-Michaud, A. (2010). Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell. Microbiol.* 12, 99–113.
- Lapaquette, P., Bringer, M.-A., and Darfeuille-Michaud, A. (2012). Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell. Microbiol.* 14, 791–807.
- Lapaquette, P., Thi Thu Nguyen, H., and Faure, M. (2017). L'autophagie garante de l'immunité et de l'inflammation. *Médecine/Sciences* 33, 305–311.
- Larabi, A., Barnich, N., and Nguyen, H.T.T. (2019). New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD. *Autophagy* 0, 1–14.
- Lassen, K.G., Kuballa, P., Conway, K.L., Patel, K.K., Becker, C.E., Peloquin, J.M., Villablanca, E.J., Norman, J.M., Liu, T.-C., Heath, R.J., et al. (2014). Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 7741–7746.
- Lassen, K.G., McKenzie, C.I., Mari, M., Murano, T., Begun, J., Baxt, L.A., Goel, G., Villablanca, E.J., Kuo, S.-Y., Huang, H., et al. (2016). Genetic Coding Variant in GPR65 Alters Lysosomal pH and Links Lysosomal Dysfunction with Colitis Risk. *Immunity* 44, 1392–1405.
- Lauro, M.L., Burch, J.M., and Grimes, C.L. (2016). The effect of NOD2 on the microbiota in Crohn's disease. *Curr. Opin. Biotechnol.* 40, 97–102.
- Lavoie, S., Conway, K.L., Lassen, K.G., Jijon, H.B., Pan, H., Chun, E., Michaud, M., Lang, J.K., Gallini Comeau, C.A., Dreyfuss, J.M., et al. (2019). The Crohn's disease polymorphism, ATG16L1 T300A, alters the gut microbiota and enhances the local Th1/Th17 response. *Elife* 8, 1–28.
- Lee, I.-A., and Kim, D.-H. (2011). *Klebsiella pneumoniae* increases the risk of inflammation and colitis in a murine model of intestinal bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 46, 684–693.
- Lee, I.H., and Finkel, T. (2009). Regulation of Autophagy by the p300 Acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* 284, 6322–6328.
- Lee, J.M., and Lee, K.M. (2016). Endoscopic diagnosis and differentiation of inflammatory bowel disease. *Clin. Endosc.* 49, 370–375.
- Lee, H.K., Mattei, L.M., Steinberg, B.E., Alberts, P., Lee, Y.H., Chervonsky, A., Mizushima, N., Grinstein, S., and Iwasaki, A. (2010). In Vivo Requirement for Atg5 in Antigen Presentation by Dendritic Cells. *Immunity* 32, 227–239.
- Lee, Y.S., Pressman, S., Address, A.P., Kim, K., White, J.L., Cassidy, J.J., Li, X., Lubell, K., Lim, D.H., Cho, I.S., et al. (2009). Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. *Nat. Cell Biol.* 11, 1150–1156.
- Leoni, G., Alam, A., Neumann, P., Lambeth, J.D., Cheng, G., McCoy, J., Hilgarth, R.S., Kundu, K., Murthy, N., Kusters, D., et al. (2013). Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair. *J. Clin. Invest.* 123, 443–454.
- Leoni, G., Neumann, P.-A., Kamaly, N., Quiros, M., Nishio, H., Jones, H.R., Sumagin, R., Hilgarth, R.S., Alam, A.,

- Fredman, G., et al. (2015). Annexin A1-containing extracellular vesicles and polymeric nanoparticles promote epithelial wound repair. *J. Clin. Invest.* *125*, 1215–1227.
- Lepage, P., Colombet, J., Marteau, P., Sime-Ngando, T., Doré, J., and Leclerc, M. (2008). Dysbiosis in inflammatory bowel disease: A role for bacteriophages? *Gut* *57*, 424–425.
- Levine, A., Kori, M., Kierkus, J., Sigall Boneh, R., Sladek, M., Escher, J.C., Wine, E., Yerushalmi, B., Amil Dias, J., Shaoul, R., et al. (2019). Azithromycin and metronidazole versus metronidazole-based therapy for the induction of remission in mild to moderate paediatric Crohn's disease: A randomised controlled trial. *Gut* *68*, 239–247.
- Lewis, J.D., Chen, E.Z., Baldassano, R.N., Otley, A.R., Griffiths, A.M., Lee, D., Bittinger, K., Bailey, A., Friedman, E.S., Hoffmann, C., et al. (2015). Inflammation, Antibiotics, and Diet as Environmental Stressors of the Gut Microbiome in Pediatric Crohn's Disease. *Cell Host Microbe* *18*, 489–500.
- Li, N., and Shi, R. (2019). Expression alteration of long non-coding RNAs and their target genes in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Clin. Chim. Acta* *494*, 14–21.
- Li, D., Liu, J., Guo, B., Liang, C., Dang, L., Lu, C., He, X., Cheung, H.Y.-S., Xu, L., Lu, C., et al. (2016a). Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation. *Nat. Commun.* *7*, 10872.
- Li, E., Hamm, C.M., Gulati, A.S., Sartor, R.B., Chen, H., Wu, X., Zhang, T., Rohlf, F.J., Zhu, W., Gu, C., et al. (2012). Inflammatory Bowel Diseases Phenotype, *C. difficile* and NOD2 Genotype Are Associated with Shifts in Human Ileum Associated Microbial Composition. *PLoS One* *7*, e26284.
- Li, J., Qi, W., Chen, G., Feng, D., Liu, J., Ma, B., Zhou, C., Mu, C., Zhang, W., Chen, Q., et al. (2015a). Mitochondrial outer-membrane E3 ligase MUL1 ubiquitinates ULK1 and regulates selenite-induced mitophagy. *Autophagy* *11*, 1216–1229.
- Li, P., Kaslan, M., Lee, S.H., Yao, J., and Gao, Z. (2017). Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* *7*, 789–804.
- Li, Q., Wang, C., Tang, C., He, Q., Li, N., and Li, J. (2014). Dysbiosis of Gut Fungal Microbiota is Associated With Mucosal Inflammation in Crohn's Disease. *J. Clin. Gastroenterol.* *48*, 513–523.
- Li, Q., Fang, Y., Zhu, P., Ren, C., Chen, H., Gu, J., Jia, Y., Wang, K., Tong, W., Zhang, W., et al. (2015b). *Burkholderia pseudomallei* survival in lung epithelial cells benefits from miRNA-mediated suppression of ATG10. *Autophagy* *11*, 1293–1307.
- Li, S., Qiang, Q., Shan, H., Shi, M., Gan, G., Ma, F., and Chen, B. (2016b). MiR-20a and miR-20b negatively regulate autophagy by targeting RB1CC1/FIP200 in breast cancer cells. *Life Sci.* *147*, 143–152.
- Li, S.S., Zhu, A., Benes, V., Costea, P.I., Hercog, R., Hildebrand, F., Huerta-Cepas, J., Nieuwdorp, M., Salojärvi, J., Voigt, A.Y., et al. (2016c). Durable coexistence of donor and recipient strains after fecal microbiota transplantation. *Science* (80-.). *352*, 586–589.
- Liang, Y., Eng, W.S., Colquhoun, D.R., Dinglasan, R.R., Graham, D.R., and Mahal, L.K. (2014). Complex N-Linked Glycans Serve as a Determinant for Exosome/Microvesicle Cargo Recruitment. *J. Biol. Chem.* *289*, 32526–32537.
- Lidar, M., Langevitz, P., Barzilai, O., Ram, M., Porat-Katz, B.-S., Bizzaro, N., Tonutti, E., Maieron, R., Chowers, Y., Bar-Meir, S., et al. (2009). Infectious Serologies and Autoantibodies in Inflammatory Bowel Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1173*, 640–648.
- Liguori, G., Lamas, B., Richard, M.L., Brandi, G., da Costa, G., Hoffmann, T.W., Di Simone, M.P., Calabrese, C., Poggioli, G., Langella, P., et al. (2016). Fungal Dysbiosis in Mucosa-associated Microbiota of Crohn's Disease Patients. *J. Crohn's Colitis* *10*, 296–305.
- Limketkai, B.N., Iheozor-Ejiofor, Z., Gjuladin-Hellon, T., Parian, A., Matarese, L.E., Bracewell, K., MacDonald, J.K., Gordon, M., and Mullin, G.E. (2019). Dietary interventions for induction and maintenance of remission in inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* *2019*.
- Lin, J., Cao, Q., Zhang, J., Li, Y., Shen, B., Zhao, Z., Chinnaiyan, A.M., and Bronner, M.P. (2013). MicroRNA expression patterns in indeterminate inflammatory bowel disease. *Mod. Pathol.* *26*, 148–154.
- Lin, J., Welker, N.C., Zhao, Z., Li, Y., Zhang, J., Reuss, S.A., Zhang, X., Lee, H., Liu, Y., and Bronner, M.P. (2014). Novel specific microRNA biomarkers in idiopathic inflammatory bowel disease unrelated to disease activity. *Mod. Pathol.* *27*, 602–608.
- Lin, J., Zhang, X., Zhao, Z., Welker, N.C., Li, Y., Liu, Y., and Bronner, M.P. (2016). Novel MicroRNA Signature to Differentiate Ulcerative Colitis from Crohn Disease: A Genome-Wide Study Using Next Generation Sequencing. *MicroRNA (Shariqah, United Arab Emirates)* *5*, 222–229.
- Lin, S.-Y., Li, T.Y., Liu, Q., Zhang, C.-S., Li, X., Chen, Y., Zhang, S.-M., Lian, G., Liu, Q., Ruan, K., et al. (2012a). GSK3-TIP60-ULK1 Signaling Pathway Links Growth Factor Deprivation to Autophagy. *Science* (80-.). *336*, 477–481.
- Lin, X., Zheng, X., Fan, D., Yao, Q., Hu, J., Lian, L., Wu, X., Lan, P., and He, X. (2018). MicroRNA-143 Targets ATG2B to Inhibit Autophagy and Increase Inflammatory Responses in Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *24*, 781–791.
- Lin, Z., Hegarty, J.P., Yu, W., Cappel, J.A., Chen, X., Faber, P.W., Wang, Y., Poritz, L.S., Fan, J.-B., and Koltun, W.A. (2012b). Identification of Disease-Associated DNA Methylation in B Cells from Crohn's Disease and Ulcerative Colitis Patients. *Dig. Dis. Sci.* *57*, 3145–3153.
- Lindoso, L., Mondal, K., Venkateswaran, S., Somineni, H.K., Ballengee, C., Walters, T.D., Griffiths, A., Noe, J.D., Crandall, W., Snapper, S., et al. (2018). The Effect of Early-Life Environmental Exposures on Disease Phenotype and Clinical Course of Crohn's Disease in Children. *Am. J. Gastroenterol.* *113*, 1524–1529.
- Ling, J., Kang, Y., Zhao, R., Xia, Q., Lee, D.-F., Chang, Z., Li, J., Peng, B., Fleming, J.B., Wang, H., et al. (2012). KrasG12D-Induced IKK2/ β /NF- κ B Activation by IL-1 α and p62 Feedforward Loops Is Required for Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* *21*, 105–120.
- Liu, B., Gulati, A.S., Cantillana, V., Henry, S.C., Schmidt, E.A., Daniell, X., Grossniklaus, E., Schoenborn, A.A., Sartor, R.B., and Taylor, G.A. (2013). Irgm1-deficient mice exhibit Paneth cell abnormalities and increased susceptibility to acute intestinal inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *305*, G573-84.
- Liu, C.-C., Lin, Y.-C., Chen, Y.-H., Chen, C.-M., Pang, L.-Y., Chen, H.-A., Wu, P.-R., Lin, M.-Y., Jiang, S.-T., Tsai,

T.-F., et al. (2016a). Cul3-KLHL20 Ubiquitin Ligase Governs the Turnover of ULK1 and VPS34 Complexes to Control Autophagy Termination. *Mol. Cell* 61, 84–97.

Liu, C., Wang, J., Yang, Y., Liu, X., Zhu, Y., Zou, J., Peng, S., Le, T.H., Chen, Y., Zhao, S., et al. (2018a). Ginsenoside Rd ameliorates colitis by inducing p62-driven mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome inactivation in mice. *Biochem. Pharmacol.* 155, 366–379.

Liu, F., Chen, J., Wang, P., Li, H., Zhou, Y., Liu, H., Liu, Z., Zheng, R., Wang, L., Yang, H., et al. (2018b). MicroRNA-27a controls the intracellular survival of Mycobacterium tuberculosis by regulating calcium-associated autophagy. *Nat. Commun.* 9, 4295.

Liu, K., Guo, C., Lao, Y., Yang, J., Chen, F., Zhao, Y., Yang, Y., Yang, J., and Yi, J. (2019). A fine-tuning mechanism underlying self-control for autophagy: deSUMOylation of BECN1 by SENP3. *Autophagy* 0, 1–16.

Liu, P.-F., Cheng, J.-S., Sy, C.-L., Huang, W.-C., Yang, H.-C., Gallo, R.L., Huang, C.-M., and Shu, C.-W. (2015). IsaB Inhibits Autophagic Flux to Promote Host Transmission of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *J. Invest. Dermatol.* 135, 2714–2722.

Liu, S., da Cunha, A.P., Rezende, R.M., Cialic, R., Wei, Z., Bry, L., Comstock, L.E., Gandhi, R., and Weiner, H.L. (2016b). The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal MicroRNA. *Cell Host Microbe* 19, 32–43.

Liu, T.C., Kern, J.T., VanDussen, K.L., Xiong, S., Kaiko, G.E., Wilen, C.B., Rajala, M.W., Caruso, R., Holtzman, M.J., Gao, F., et al. (2018c). Interaction between smoking and ATG16L1 T300A triggers Paneth cell defects in Crohn's disease. *J. Clin. Invest.* 128, 5110–5122.

Liu, Y., van Kruiningen, H.J., West, A.B., Cartun, R.W., Cortot, A., and Colombel, J.F. (1995). Immunocytochemical evidence of Listeria, Escherichia coli, and Streptococcus antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology* 108, 1396–1404.

Liu, Y., Dong, Y., Zhu, X., Fan, H., Xu, M., Chen, Q., Nan, Z., Wu, H., Deng, S., Liu, X., et al. (2018d). MiR-155 inhibition ameliorates 2, 4, 6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)-induced experimental colitis in rat via influencing the differentiation of Th17 cells by Jarid2. *Int. Immunopharmacol.* 64, 401–410.

Llorente, A., Skotland, T., Sylvänne, T., Kauhanen, D., Róg, T., Orłowski, A., Vattulainen, I., Ekroos, K., and Sandvig, K. (2013). Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1831, 1302–1309.

Löffler, A.S., Alers, S., Dieterle, A.M., Keppeler, H., Franz-Wachtel, M., Kundu, M., Campbell, D.G., Wesselborg, S., Alessi, D.R., and Stork, B. (2011). Ulk1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop. *Autophagy* 7, 696–706.

van de Logt, F., and Day, A.S. (2013). S100A12: A noninvasive marker of inflammation in inflammatory bowel disease. *J. Dig. Dis.* 14, 62–67.

Lopes, F., Keita, A. V., Saxena, A., Reyes, J.L., Mancini, N.L., Al Rajabi, A., Wang, A., Baggio, C.H., Dickey, M., van Dalen, R., et al. (2018). ER-stress mobilization of death-associated protein kinase-1-dependent xenophagy counteracts mitochondria stress-induced epithelial barrier dysfunction. *J. Biol. Chem.* 293, 3073–3087.

Low, D., Tran, H.T., Lee, I., Dreux, N., Kamba, A., Reinecker, H., Darfeuille-Michaud, A., Barnich, N., and Mizoguchi, E. (2013). Chitin-Binding Domains of Escherichia Coli ChiA Mediate Interactions With Intestinal Epithelial Cells in Mice With Colitis. *Gastroenterology* 145, 602-612.e9.

Lu, C., Chen, J., Xu, H.G., Zhou, X., He, Q., Li, Y.L., Jiang, G., Shan, Y., Xue, B., Zhao, R.X., et al. (2014). MIR106B and MIR93 prevent removal of bacteria from epithelial cells by disrupting ATG16L1-mediated autophagy. *Gastroenterology* 146, 188–199.

Lu, L., Wang, J., Zhang, F., Chai, Y., Brand, D., Wang, X., Horwitz, D.A., Shi, W., and Zheng, S.G. (2010). Role of SMAD and Non-SMAD Signals in the Development of Th17 and Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 184, 4295–4306.

Lucas, C., Barnich, N., and Nguyen, H.T.T. (2017). Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1310.

Łusiak-Szelachowska, M., Weber-Dąbrowska, B., Jończyk-Matysiak, E., Wojciechowska, R., and Górski, A. (2017). Bacteriophages in the gastrointestinal tract and their implications. *Gut Pathog.* 9, 44.

Lv, L., Li, C., Zhang, X., Ding, N., Cao, T., Jia, X., Wang, J., Pan, L., Jia, H., Li, Z., et al. (2017). RNA Profiling Analysis of the Serum Exosomes Derived from Patients with Active and Latent Mycobacterium tuberculosis Infection. *Front. Microbiol.* 8, 1–10.

Lystad, A.H., Carlsson, S.R., de la Ballina, L.R., Kauffman, K.J., Nag, S., Yoshimori, T., Melia, T.J., and Simonsen, A. (2019). Distinct functions of ATG16L1 isoforms in membrane binding and LC3B lipidation in autophagy-related processes. *Nat. Cell Biol.* 21, 372–383.

Lyu, L., Zhang, X., Li, C., Yang, T., Wang, J., Pan, L., Jia, H., Li, Z., Sun, Q., Yue, L., et al. (2019). Small RNA Profiles of Serum Exosomes Derived From Individuals With Latent and Active Tuberculosis. *Front. Microbiol.* 10, 1–10.

M

Ma, D., Panda, S., and Lin, J.D. (2011). Temporal orchestration of circadian autophagy rhythm by C/EBPβ. *EMBO J.* 30, 4642–4651.

Ma, Y., Galluzzi, L., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2013). Autophagy and Cellular Immune Responses. *Immunity* 39, 211–227.

Ma, Z.J., Wang, Y.H., Li, Z.G., Wang, Y., Li, B.Y., Kang, H.Y., and Wu, X.Y. (2019). Immunosuppressive Effect of Exosomes from Mesenchymal Stromal Cells in Defined Medium on Experimental Colitis. *Int. J. Stem Cells* 1–9.

- Maconi, G., Ardizzone, S., Cucino, C., Bezzio, C., Russo, A.-G., and Bianchi Porro, G. (2010). Pre-illness changes in dietary habits and diet as a risk factor for inflammatory bowel disease: a case-control study. *World J. Gastroenterol.* *16*, 4297–4304.
- Mahon, R.N., Sande, O.J., Rojas, R.E., Levine, A.D., Harding, C. V., and Henry Boom, W. (2012). Mycobacterium tuberculosis ManLAM inhibits T-cell-receptor signaling by interference with ZAP-70, Lck and LAT phosphorylation. *Cell. Immunol.* *275*, 98–105.
- Mai, C.-T., Wu, M.-M., Wang, C.-L., Su, Z.-R., Cheng, Y.-Y., and Zhang, X.-J. (2019). Palmatine attenuated dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis via promoting mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome inactivation. *Mol. Immunol.* *105*, 76–85.
- Maillard, F., Vazeille, E., Sauvanet, P., Sirvent, P., Bonnet, R., Combaret, L., Chausse, P., Chevarin, C., Otero, Y.F., Delcros, G., et al. (2019). Preventive Effect of Spontaneous Physical Activity on the Gut-Adipose Tissue in a Mouse Model That Mimics Crohn's Disease Susceptibility. *Cells* *8*, 33.
- Majumdar, R., Tavakoli Tameh, A., and Parent, C.A. (2016). Exosomes Mediate LTB4 Release during Neutrophil Chemotaxis. *PLOS Biol.* *14*, e1002336.
- Manca, S., Upadhyaya, B., Mutai, E., Desaulniers, A.T., Cederberg, R.A., White, B.R., and Zemleni, J. (2018). Milk exosomes are bioavailable and distinct microRNA cargos have unique tissue distribution patterns. *Sci. Rep.* *8*, 11321.
- Manichanh, C., Borruel, N., Casellas, F., and Guarner, F. (2012). The gut microbiota in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *9*, 599–608.
- Manzaniello, P.S., Ayres, J.S., Watson, R.O., Collins, A.C., Souza, G., Rae, C.S., Schneider, D.S., Nakamura, K., Shiloh, M.U., and Cox, J.S. (2013). The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. *Nature* *501*, 512–516.
- Mao, F., Wu, Y., Tang, X., Kang, J., Zhang, B., Yan, Y., Qian, H., Zhang, X., and Xu, W. (2017). Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Relieve Inflammatory Bowel Disease in Mice. *Biomed Res. Int.* *2017*, 1–12.
- Marchiando, A.M., Ramanan, D., Ding, Y., Gomez, L.E., Hubbard-Lucey, V.M., Maurer, K., Wang, C., Ziel, J.W., van Rooijen, N., Nuñez, G., et al. (2013). A deficiency in the autophagy gene Atg16L1 enhances resistance to enteric bacterial infection. *Cell Host Microbe* *14*, 216–224.
- Martin-Jaular, L., Nakayasu, E.S., Ferrer, M., Almeida, I.C., and del Portillo, H.A. (2011). Exosomes from Plasmodium yoelii-infected reticulocytes protect mice from lethal infections. *PLoS One* *6*, 1–10.
- Martin, H.M., Campbell, B.J., Hart, C.A., Mpfu, C., Nayar, M., Singh, R., Englyst, H., Williams, H.F., and Rhodes, J.M. (2004). Enhanced Escherichia coli adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* *127*, 80–93.
- Martin, P.K., Marchiando, A., Xu, R., Rudensky, E., Yeung, F., Schuster, S.L., Kernbauer, E., and Cadwell, K. (2018). Autophagy proteins suppress protective type I interferon signalling in response to the murine gut microbiota. *Nat. Microbiol.* *3*, 1131–1141.
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Gonzalez-Huix, F., Acero, D., and Garcia-Gil, J.L. (2006). Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Inflamm. Bowel Dis.* *12*, 1136–1145.
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M., González-Huix, F., López-Oliu, C., Dahbi, G., Blanco, J.E., Blanco, J., Garcia-Gil, J.L., and Darfeuille-Michaud, A. (2009a). Molecular diversity of Escherichia coli in the human gut: New ecological evidence supporting the role of adherent-invasive E. coli (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *15*, 872–882.
- Martinez-Medina, M., Naves, P., Blanco, J., Aldeguer, X., Blanco, J.E., Blanco, M., Ponte, C., Soriano, F., Darfeuille-Michaud, A., and Garcia-Gil, J.L. (2009b). Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive Escherichia coli (AIEC). *BMC Microbiol.* *9*, 202.
- Martinez-Medina, M., Denizot, J., Dreux, N., Robin, F., Billard, E., Bonnet, R., Darfeuille-Michaud, A., and Barnich, N. (2014). Western diet induces dysbiosis with increased e coli in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut* *63*, 116–124.
- Masseret, E., Boudeau, J., Colombel, J.F., Neut, C., Desreumaux, P., Joly, B., Cortot, A., and Darfeuille-Michaud, A. (2001). Genetically related Escherichia coli strains associated with Crohn's disease. *Gut* *48*, 320–325.
- Mathivanan, S., Lim, J.W.E., Tauro, B.J., Ji, H., Moritz, R.L., and Simpson, R.J. (2010). Proteomics Analysis of A33 Immunoaffinity-purified Exosomes Released from the Human Colon Tumor Cell Line LIM1215 Reveals a Tissue-specific Protein Signature. *Mol. Cell. Proteomics* *9*, 197–208.
- Matsuda, C., Ito, T., Song, J., Mizushima, T., Tamagawa, H., Kai, Y., Hamanaka, Y., Inoue, M., Nishida, T., Matsuda, H., et al. (2007). Therapeutic effect of a new immunosuppressive agent, everolimus, on interleukin-10 gene-deficient mice with colitis. *Clin. Exp. Immunol.* *148*, 348–359.
- Matsuzawa-Ishimoto, Y., Shono, Y., Gomez, L.E., Hubbard-Lucey, V.M., Cammer, M., Neil, J., Dewan, M.Z., Lieberman, S.R., Lazrak, A., Marinis, J.M., et al. (2017). Autophagy protein ATG16L1 prevents necroptosis in the intestinal epithelium. *J. Exp. Med.* *20170558*.
- Mazzarella, G., Perna, A., Marano, A., Lucariello, A., Rotondi Aufiero, V., Sorrentino, A., Melina, R., Guerra, G., Taccone, F.S., Iaquinto, G., et al. (2017). Pathogenic Role of Associated Adherent-Invasive Escherichia coli in Crohn's Disease. *J. Cell. Physiol.* *232*, 2860–2868.
- McCormick, J., Suleman, N., Scarabelli, T.M., Knight, R.A., Latchman, D.S., and Stephanou, A. (2012). STAT1 deficiency in the heart protects against myocardial infarction by enhancing autophagy. *J. Cell. Mol. Med.* *16*, 386–393.
- McGuckin, M.A., Lindén, S.K., Sutton, P., and Florin, T.H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* *9*, 265–278.
- McKelvey, K.J., Powell, K.L., Ashton, A.W., Morris, J.M., and McCracken, S.A. (2015). Exosomes: Mechanisms of

Uptake. *J. Circ. Biomarkers* 1.

McKenzie, A.J., Hoshino, D., Hong, N.H., Cha, D.J., Franklin, J.L., Coffey, R.J., Patton, J.G., and Weaver, A.M. (2016). KRAS-MEK Signaling Controls Ago2 Sorting into Exosomes. *Cell Rep.* 15, 978–987.

McNees, A.L., Markesich, D., Zayyani, N.R., and Graham, D.Y. (2015). Mycobacterium paratuberculosis as a cause of crohn's disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 1523–1534.

McPhee, J.B., Small, C.L., Reid-Yu, S.A., Brannon, J.R., Moual, H. Le, and Coombes, B.K. (2014). Host defense peptide resistance contributes to colonization and maximal intestinal pathology by Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli. *Infect. Immun.* 82, 3383–3393.

Meconi, S., Vercellone, A., Levillain, F., Payré, B., Al Saati, T., Capilla, F., Desreumaux, P., Darfeuille-Michaud, A., and Altare, F. (2007). Adherent-invasive Escherichia coli isolated from Crohn's disease patients induce granulomas in vitro. *Cell. Microbiol.* 9, 1252–1261.

Meddens, C.A., Harakalova, M., van den Dungen, N.A.M., Foroughi Asl, H., Hijma, H.J., Cuppen, E.P.J.G., Björkregren, J.L.M., Asselbergs, F.W., Nieuwenhuis, E.E.S., and Mokry, M. (2016). Systematic analysis of chromatin interactions at disease associated loci links novel candidate genes to inflammatory bowel disease. *Genome Biol.* 17, 247.

Mehto, S., Jena, K.K., Nath, P., Chauhan, S., Kolapalli, S.P., Das, S.K., Sahoo, P.K., Jain, A., Taylor, G.A., and Chauhan, S. (2019). The Crohn's Disease Risk Factor IRGM Limits NLRP3 Inflammasome Activation by Impeding Its Assembly and by Mediating Its Selective Autophagy. *Mol. Cell* 73, 429–445.e7.

Meningher, T., Lerman, G., Regev-Rudzki, N., Gold, D., Ben-Dov, I., Sidi, Y., Avni, D., and Schwartz, E. (2016). Schistosomal miRNAs isolated from Extracellular Vesicles in sera of infected patients; a new tool for diagnosis and follow-up of human schistosomiasis. *J. Infect. Dis.* 215, jiw539.

Mestre, M.B., Fader, C.M., Sola, C., and Colombo, M.I. (2010). α -hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in Staphylococcus aureus infected cells. *Autophagy* 6, 110–125.

Meuwis, M.-A., Fillet, M., Geurts, P., de Seny, D., Lutteri, L., Chapelle, J.-P., Bours, V., Wehenkel, L., Belaiche, J., Malaise, M., et al. (2007). Biomarker discovery for inflammatory bowel disease, using proteomic serum profiling. *Biochem. Pharmacol.* 73, 1422–1433.

Michielan, A., and D'Inca, R. (2015). Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators Inflamm.* 2015, 628157.

Migliore, F., Macchi, R., Landini, P., and Paroni, M. (2018). Phagocytosis and Epithelial Cell Invasion by Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli Are Inhibited by the Anti-inflammatory Drug 6-Mercaptopurine. *Front. Microbiol.* 9, 1–15.

Mikhaylova, O., Stratton, Y., Hall, D., Kellner, E., Ehmer, B., Drew, A.F., Gallo, C.A., Plas, D.R., Biesiada, J., Meller, J., et al. (2012). VHL-Regulated MiR-204 Suppresses Tumor Growth through Inhibition of LC3B-Mediated Autophagy in Renal Clear Cell Carcinoma. *Cancer Cell* 21, 532–546.

Milani, M., Rzymiski, T., Mellor, H.R., Pike, L., Bottini, A., Generali, D., and Harris, A.L. (2009). The Role of ATF4 Stabilization and Autophagy in Resistance of Breast Cancer Cells Treated with Bortezomib. *Cancer Res.* 69, 4415–4423.

Mimouna, S., Bazin, M., Mograbi, B., Darfeuille-Michaud, A., Brest, P., Hofman, P., and Vouret-Craviari, V. (2014). HIF1A regulates xenophagic degradation of adherent and invasive Escherichia coli (AIEC). *Autophagy* 10, 2333–2345.

Min, M., Peng, L., Yang, Y., Guo, M., Wang, W., and Sun, G. (2014). MicroRNA-155 Is Involved in the Pathogenesis of Ulcerative Colitis by Targeting FOXO3a. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 652–659.

Minowa-Nozawa, A., Nozawa, T., Okamoto-Furuta, K., Kohda, H., and Nakagawa, I. (2017). Rab35 GTPase recruits NDP52 to autophagy targets. *EMBO J.* 36, 2790–2807.

Miquel, S., Peyretaillade, E., Claret, L., de Vallée, A., Dossat, C., Vacherie, B., Zineb, E.H., Segurens, B., Barbe, V., Sauvanet, P., et al. (2010). Complete Genome Sequence of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive E. coli Strain LF82. *PLoS One* 5, e12714.

Mirza, A.H., Kaur, S., Brorsson, C.A., and Pociot, F. (2014). Effects of GWAS-Associated Genetic Variants on lncRNAs within IBD and T1D Candidate Loci. *PLoS One* 9, e105723.

Mirza, A.H., Berthelsen, C.H.B., Seemann, S.E., Pan, X., Frederiksen, K.S., Vilien, M., Gorodkin, J., and Pociot, F. (2015). Transcriptomic landscape of lncRNAs in inflammatory bowel disease. *Genome Med.* 7, 39.

Mitchell, G., Ge, L., Huang, Q., Chen, C., Kianian, S., Roberts, M.F., Schekman, R., and Portnoy, D.A. (2015). Avoidance of Autophagy Mediated by PlcA or ActA Is Required for Listeria monocytogenes Growth in Macrophages. *Infect. Immun.* 83, 2175–2184.

Mitchell, G., Cheng, M.I., Chen, C., Nguyen, B.N., Whiteley, A.T., Kianian, S., Cox, J.S., Green, D.R., McDonald, K.L., and Portnoy, D.A. (2018). Listeria monocytogenes triggers noncanonical autophagy upon phagocytosis, but avoids subsequent growth-restricting xenophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E210–E217.

Mitsuhashi, S., Feldbrügge, L., Csizmadia, E., Mitsuhashi, M., Robson, S.C., and Moss, A.C. (2016). Luminal Extracellular Vesicles (EVs) in Inflammatory Bowel Disease (IBD) Exhibit Proinflammatory Effects on Epithelial Cells and Macrophages. *Inflamm. Bowel Dis.* 22, 1587–1595.

Miyaguchi, Y., Tsuchiya, K., and Sakamoto, K. (2009). P53 negatively regulates the transcriptional activity of FOXO3a under oxidative stress. *Cell Biol. Int.* 33, 853–860.

Miyoshi, J., Bobe, A.M., Miyoshi, S., Huang, Y., Hubert, N., Delmont, T.O., Eren, A.M., Leone, V., and Chang, E.B. (2017). Peripartum exposure to antibiotics promotes persistent gut dysbiosis, immune imbalance, and inflammatory bowel disease in genetically prone offspring. *Cell Rep* 20, 87–92.

Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395, 395–398.

Mizushima, N., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2002). Autophagosome Formation in Mammalian Cells Tracing of autophagosome formation with mammalian Apg proteins Initial step of autophagosome formation. *Cell* 112, 421–429.

Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., and

- Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J. Cell Sci.* *116*, 1679–1688.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011). The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *27*, 107–132.
- Möbius, W., van Donselaar, E., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Heijnen, H.F.G., Slot, J.W., and Geuze, H.J. (2003). Recycling Compartments and the Internal Vesicles of Multivesicular Bodies Harbor Most of the Cholesterol Found in the Endocytic Pathway. *Traffic* *4*, 222–231.
- Mohammadi, A., Kelly, O.B., Smith, M.I., Kabakchiev, B., and Silverberg, M.S. (2019). Differential miRNA Expression in Ileal and Colonic Tissues Reveals an Altered Immunoregulatory Molecular Profile in Individuals With Crohn's Disease versus Healthy Subjects. *J. Crohn's Colitis*.
- Mohanan, V., Nakata, T., Desch, A.N., Lévesque, C., Boroughs, A., Guzman, G., Cao, Z., Creasey, E., Yao, J., Boucher, G., et al. (2018). C1orf106 is a colitis risk gene that regulates stability of epithelial adherens junctions. *0814*, 1–11.
- Mokry, M., Middendorp, S., Wiegerinck, C.L., Witte, M., Teunissen, H., Meddens, C.A., Cuppen, E., Clevers, H., and Nieuwenhuis, E.E.S. (2014). Many inflammatory bowel disease risk loci include regions that regulate gene expression in immune cells and the intestinal epithelium. *Gastroenterology* *146*, 1040–1047.
- Molejon, M.I., Ropolo, A., Re, A. Lo, Boggio, V., and Vaccaro, M.I. (2013). The VMP1-Beclin 1 interaction regulates autophagy induction. *Sci. Rep.* *3*, 1055.
- Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Trachtenberg, A.J., Hochberg, F.H., Skog, J., and Kuo, W.P. (2012). Impact of Biofluid Viscosity on Size and Sedimentation Efficiency of the Isolated Microvesicles. *Front. Physiol.* *3*, 1–7.
- Momen-Heravi, F., Bala, S., Bukong, T., and Szabo, G. (2014). Exosome-mediated delivery of functionally active miRNA-155 inhibitor to macrophages. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* *10*, 1517–1527.
- Moreau, K., Lacas-Gervais, S., Fujita, N., Sebbane, F., Yoshimori, T., Simonet, M., and Lafont, F. (2010). Autophagosomes can support *Yersinia pseudotuberculosis* replication in macrophages. *Cell. Microbiol.* *12*, 1108–1123.
- Morelli, A.E. (2001). Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. *Blood* *98*, 1512–1523.
- Moreno-Gonzalo, O., Fernandez-Delgado, I., and Sanchez-Madrid, F. (2018). Post-translational add-ons mark the path in exosomal protein sorting. *Cell. Mol. Life Sci.* *75*, 1–19.
- Moresi, V., Carrer, M., Grueter, C.E., Rifki, O.F., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2012). Histone deacetylases 1 and 2 regulate autophagy flux and skeletal muscle homeostasis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 1649–1654.
- Moretti, J., Roy, S., Bozec, D., Martinez, J., Chapman, J.R., Ueberheide, B., Lamming, D.W., Chen, Z.J., Horng, T., Yeretsian, G., et al. (2017). STING Senses Microbial Viability to Orchestrate Stress-Mediated Autophagy of the Endoplasmic Reticulum. *Cell* *171*, 809–823.e13.
- Morgan, X.C., Tickle, T.L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K.L., Ward, D. V., Reyes, J.A., Shah, S.A., LeLeiko, N., Snapper, S.B., et al. (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* *13*, R79.
- El Mouzan, M., Wang, F., Al Mofarreh, M., Menon, R., Al Barrag, A., Korolev, K.S., Al Sarkhy, A., Al Asmi, M., Hamed, Y., Saeed, A., et al. (2016). Fungal Microbiota Profile in Newly Diagnosed Treatment-naïve Children with Crohn's disease. *J. Crohn's Colitis* *391*, jjw197.
- Mow, W.S., Vasiliauskas, E.A., Lin, Y.-C., Fleshner, P.R., Papadakis, K.A., Taylor, K.D., Landers, C.J., Abreu-Martin, M.T., Rotter, J.I., Yang, H., et al. (2004). Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* *126*, 414–424.
- Muise, A.M., Walters, T.D., Glowacka, W.K., Griffiths, A.M., Ngan, B., Lan, H., Xu, W., Silverberg, M.S., and Rotin, D. (2009). Polymorphisms in E-cadherin (CDH1) result in a mis-localised cytoplasmic protein that is associated with Crohn's disease. *1121–1127*.
- Mukherjee, K., Ghoshal, B., Ghosh, S., Chakrabarty, Y., Shwetha, S., Das, S., and Bhattacharyya, S.N. (2016). Reversible HuR-microRNA binding controls extracellular export of miR-122 and augments stress response. *EMBO Rep.* *17*, 1184–1203.
- Muller, L., Mitsushashi, M., Simms, P., Gooding, W.E., and Whiteside, T.L. (2016). Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets. *Sci. Rep.* *6*, 20254.
- Müller, S., Schaffer, T., Schoepfer, A.M., Hilty, A., Bodmer, T., and Seibold, F. (2008). Partial overlap of anti-mycobacterial, and anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies in Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* *14*, 3650–3661.
- Munyaka, P.M., Sepehri, S., Ghia, J.E., and Khafipour, E. (2016). Carrageenan gum and adherent invasive *Escherichia coli* in a piglet model of inflammatory bowel disease: Impact on intestinal mucosa-associated microbiota. *Front. Microbiol.* *7*.
- Murthy, A., Li, Y., Peng, I., Reichelt, M., Katakam, A.K., Noubade, R., Roose-Girma, M., DeVoss, J., Diehl, L., Graham, R.R., et al. (2014). A Crohn's disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature* *506*, 456–462.
- Mutalib, M., Borrelli, O., Blackstock, S., Kiparissi, F., Elawad, M., Shah, N., and Lindley, K. (2014). The use of sirolimus (rapamycin) in the management of refractory inflammatory bowel disease in children. *J. Crohn's Colitis* *8*, 1730–1734.

N

- Al Nabhani, Z., Dietrich, G., Hugot, J.P., and Barreau, F. (2017). Nod2: The intestinal gate keeper. *PLoS Pathog.* *13*, 1–19.

- Naidu, S.R., Lakhter, A.J., and Androphy, E.J. (2012). PIASy-mediated Tip60 sumoylation regulates p53-induced autophagy. *Cell Cycle* *11*, 2717–2728.
- Nakatogawa, H. (2013). Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy. *Essays Biochem.* *55*, 39–50.
- Narita, T., Weinert, B.T., and Choudhary, C. (2019). Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 156–174.
- Nata, T., Fujiya, M., Ueno, N., Moriichi, K., Konishi, H., Tanabe, H., Ohtake, T., Ikuta, K., and Kohgo, Y. (2013). MicroRNA-146b improves intestinal injury in mouse colitis by activating nuclear factor- κ B and improving epithelial barrier function. *J. Gene Med.* *15*, 249–260.
- Nath, S., Dancourt, J., Shteyn, V., Puente, G., Fong, W.M., Nag, S., Bewersdorf, J., Yamamoto, A., Antonny, B., and Melia, T.J. (2014). Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3. *Nat. Cell Biol.* *16*, 415–424.
- Navarro-Garcia, F., Ruiz-Perez, F., Cataldi, Á., and Larzábal, M. (2019). Type VI Secretion System in Pathogenic *Escherichia coli*: Structure, Role in Virulence, and Acquisition. *Front. Microbiol.* *10*.
- Nazimek, K., Ptak, W., Nowak, B., Ptak, M., Askenase, P.W., and Bryniarski, K. (2015). Macrophages play an essential role in antigen-specific immune suppression mediated by T CD8 + cell-derived exosomes. *Immunology* *146*, 23–32.
- Nazio, F., Strappazon, F., Antonioli, M., Bielli, P., Cianfanelli, V., Bordi, M., Gretzmeier, C., Dengjel, J., Piacentini, M., Fimia, G.M., et al. (2013). mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat. Cell Biol.* *15*, 406–416.
- Nazio, F., Carinci, M., Valacca, C., Bielli, P., Strappazon, F., Antonioli, M., Ciccocanti, F., Rodolfo, C., Campello, S., Fimia, G.M., et al. (2016). Fine-tuning of ULK1 mRNA and protein levels is required for autophagy oscillation. *J. Cell Biol.* *215*, 841–856.
- Nekrasova, O., and Green, K.J. (2013). Desmosome assembly and dynamics. *Trends Cell Biol.* *23*, 537–546.
- Netz, U., Carter, J., Eichenberger, M.R., Feagins, K., Galbraith, N.J., Dryden, G.W., Pan, J., Rai, S.N., and Galandiuk, S. (2018). Plasma microRNA Profile Differentiates Crohn's Colitis From Ulcerative Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* *24*, 159–165.
- Ng, S.C., Shi, H.Y., Hamidi, N., Underwood, F.E., Tang, W., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., et al. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet* *390*, 2769–2778.
- Nguyen, H.T.T., Dalmaso, G., Yan, Y., Laroui, H., Dahan, S., Mayer, L., Sitaraman, S. V., and Merlin, D. (2010). MicroRNA-7 Modulates CD98 Expression during Intestinal Epithelial Cell Differentiation. *J. Biol. Chem.* *285*, 1479–1489.
- Nguyen, H.T.T., Dalmaso, G., Müller, S., Carrière, J., Seibold, F., and 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.
- Ni, W.J., and Leng, X.M. (2015). Dynamic miRNA-mRNA paradigms: New faces of miRNAs. *Biochem. Biophys. Reports* *4*, 337–341.
- Nickerson, K.P., Homer, C.R., Kessler, S.P., Dixon, L.J., Kabi, A., Gordon, I.O., Johnson, E.E., de la Motte, C.A., and McDonald, C. (2014). The Dietary Polysaccharide Maltodextrin Promotes Salmonella Survival and Mucosal Colonization in Mice. *PLoS One* *9*, e101789.
- Nie, T., Yang, S., Ma, H., Zhang, L., Lu, F., Tao, K., Wang, R., Yang, R., Huang, L., Mao, Z., et al. (2016). Regulation of ER stress-induced autophagy by GSK3 β -TIP60-ULK1 pathway. *Cell Death Dis.* *7*, e2563–e2563.
- Van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* *121*, 337–349.
- Nielsen, H.L., Dalager-Pedersen, M., and Nielsen, H. (2019). Risk of inflammatory bowel disease after *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter concisus* infection: a population-based cohort study. *Scand. J. Gastroenterol.* *54*, 265–272.
- Nighot, P.K., Hu, C.-A.A., and Ma, T.Y. (2015). Autophagy Enhances Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier Function by Targeting Claudin-2 Protein Degradation. *J. Biol. Chem.* *290*, 7234–7246.
- Nijhuis, A., Biancheri, P., Lewis, A., Bishop, C.L., Giuffrida, P., Chan, C., Feakins, R., Poulson, R., Di Sabatino, A., Corazza, G.R., et al. (2014). In Crohn's disease fibrosis-reduced expression of the miR-29 family enhances collagen expression in intestinal fibroblasts. *Clin. Sci.* *127*, 341–350.
- Nimmo, E.R., Prendergast, J.G., Aldhous, M.C., Kennedy, N.A., Henderson, P., Drummond, H.E., Ramsahoye, B.H., Wilson, D.C., Semple, C.A., and Satsangi, J. (2012). Genome-wide methylation profiling in Crohn's disease identifies altered epigenetic regulation of key host defense mechanisms including the Th17 pathway. *Inflamm. Bowel Dis.* *18*, 889–899.
- Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2009). Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* *461*, 654–658.
- Nitzan, O., Elias, M., Chazan, Bibian, Raz, R., and Saliba, W. (2013). *Clostridium difficile* and inflammatory bowel disease: Role in pathogenesis and implications in treatment. *World J. Gastroenterol.* *19*, 7577.
- Nitzan, O., Elias, M., Peretz, A., and Saliba, W. (2016). Role of antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* *22*, 1078–1087.
- Noad, J., von der Malsburg, A., Pathe, C., Michel, M.A., Komander, D., and Randow, F. (2017). LUBAC-synthesized linear ubiquitin chains restrict cytosol-invading bacteria by activating autophagy and NF- κ B. *Nat. Microbiol.* *2*, 17063.
- Norman, J.M., Handley, S.A., Baldrige, M.T., Droit, L., Liu, C.Y., Keller, B.C., Kambal, A., Monaco, C.L., Zhao, G., Fleshner, P., et al. (2015). Disease-Specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease. *Cell* *160*, 447–460.
- Nys, K., Agostinis, P., and Vermeire, S. (2013). Autophagy: a new target or an old strategy for the treatment of Crohn's disease? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 395–401.

O

- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., and Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 9, 402.
- Oberc, A.M., Fiebig-Comyn, A.A., Tsai, C.N., Elhenawy, W., and Coombes, B.K. (2019). Antibiotics Potentiate Adherent-Invasive *E. coli* Infection and Expansion. *Inflamm. Bowel Dis.* 25, 711–721.
- Obregon, C., Rothen-Rutishauser, B., Gerber, P., Gehr, P., and Nicod, L.P. (2009). Active Uptake of Dendritic Cell-Derived Exovesicles by Epithelial Cells Induces the Release of Inflammatory Mediators through a TNF- α -Mediated Pathway. *Am. J. Pathol.* 175, 696–705.
- Ogata, M., Hino, S. -i., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., et al. (2006). Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Cell. Biol.* 26, 9220–9231.
- Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Kobayashi, T., Mimuro, H., Fukumatsu, M., Kiga, K., Piao, Z., Ashida, H., Yoshida, M., Kakuta, S., et al. (2011). A Tecpr1-Dependent Selective Autophagy Pathway Targets Bacterial Pathogens. *Cell Host Microbe* 9, 376–389.
- Ogier-Denis, E., Fasseu, M., Vandewalle, A., and Laburthe, M. (2007). MicroARN et physiopathologie intestinale. *Médecine/Sciences* 23, 509–514.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., et al. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603–606.
- Ohno, H. (2016). Intestinal M cells. *J. Biochem.* 159, 151–160.
- Ohno, M., Nishida, A., Sugitani, Y., Nishino, K., Inatomi, O., Sugimoto, M., Kawahara, M., and Andoh, A. (2017). Nanoparticle curcumin ameliorates experimental colitis via modulation of gut microbiota and induction of regulatory T cells. *PLoS One* 12, e0185999.
- Oikonomopoulos, A., Polytarchou, C., Joshi, S., Hommes, D.W., and Iliopoulos, D. (2016). Identification of Circulating MicroRNA Signatures in Crohn's Disease Using the Nanostring nCounter Technology. *Inflamm. Bowel Dis.* 22, 2063–2069.
- Ojha, R., Nandani, R., Pandey, R.K., Mishra, A., and Prajapati, V.K. (2019). Emerging role of circulating microRNA in the diagnosis of human infectious diseases. *J. Cell. Physiol.* 234, 1030–1043.
- Okoye, I.S., Coomes, S.M., Pelly, V.S., Czieso, S., Papayannopoulos, V., Tolmachova, T., Seabra, M.C., and Wilson, M.S. (2014). MicroRNA-Containing T-Regulatory-Cell-Derived Exosomes Suppress Pathogenic T Helper 1 Cells. *Immunity* 41, 89–103.
- Omidbakhsh, A., Saeedi, M., Khoshnia, M., Marjani, A., and Hakimi, S. (2018). Micro-RNAs -106a and -362-3p in Peripheral Blood of Inflammatory Bowel Disease Patients. *Open Biochem. J.* 12, 78–86.
- Oostenbrug, L.E., Drenth, J.P.H., de Jong, D.J., Nolte, I.M., Oosterom, E., van Dullemen, H.M., van der Linde, K., te Meerman, G.J., van der Steege, G., Kleibeuker, J.H., et al. (2005). Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 11, 567–575.
- Org, E., Parks, B.W., Joo, J.W.J., Emert, B., Schwartzman, W., Kang, E.Y., Mehrabian, M., Pan, C., Knight, R., Gunsalus, R., et al. (2015). Genetic and environmental control of host-gut microbiota interactions. *Genome Res.* 25, 1558–1569.
- Orholm, M., Binder, V., Sørensen, T.I., Rasmussen, L.P., and Kyvik, K.O. (2000). Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand. J. Gastroenterol.* 35, 1075–1081.
- Ortiz-Masiá, D., Cosín-Roger, J., Calatayud, S., Hernández, C., Alós, R., Hinojosa, J., Apostolova, N., Alvarez, A., and Barrachina, M.D. (2014). Hypoxic macrophages impair autophagy in epithelial cells through Wnt1: Relevance in IBD. *Mucosal Immunol.* 7, 929–938.
- Ott, S.J. (2004). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53, 685–693.
- Ouimet, M., Koster, S., Sakowski, E., Ramkhalawon, B., van Solingen, C., Oldebeken, S., Karunakaran, D., Portal-Celhay, C., Sheedy, F.J., Ray, T.D., et al. (2016). Mycobacterium tuberculosis induces the miR-33 locus to reprogram autophagy and host lipid metabolism. *Nat. Immunol.* 17, 677–686.
- Owen, K.A., Meyer, C.B., Bouton, A.H., and Casanova, J.E. (2014). Activation of Focal Adhesion Kinase by Salmonella Suppresses Autophagy via an Akt/mTOR Signaling Pathway and Promotes Bacterial Survival in Macrophages. *PLoS Pathog.* 10, e1004159.

P

- Palmela, C., Chevarin, C., Xu, Z., Torres, J., Sevrin, G., Hirten, R., Barnich, N., Ng, S.C., and Colombel, J.-F. (2017). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut* gwtjnl-2017-314903.
- Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., and Ballabio, A. (2011). Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3852–3866.
- Palmieri, O., Mazzoccoli, G., Bossa, F., Maglietta, R., Palumbo, O., Ancona, N., Corritore, G., Latiano, T., Martino, G., Rubino, R., et al. (2015). Systematic analysis of circadian genes using genome-wide cDNA microarrays in the inflammatory bowel disease transcriptome. *Chronobiol. Int.* 32, 903–916.
- Palmieri, O., Creanza, T.M., Bossa, F., Latiano, T., Corritore, G., Palumbo, O., Martino, G., Biscaglia, G., Scimeca,

- D., Carella, M., et al. (2017). Functional Implications of MicroRNAs in Crohn's Disease Revealed by Integrating MicroRNA and Messenger RNA Expression Profiling. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 1580.
- Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., and Johnstone, R.M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* *101*, 942–948.
- Paraskevi, A., Theodoropoulos, G., Papaconstantinou, I., Mantzaris, G., Nikiteas, N., and Gazouli, M. (2012). Circulating MicroRNA in inflammatory bowel disease. *J. Crohn's Colitis* *6*, 900–904.
- Parigi, S.M., Eldh, M., Larssen, P., Gabrielsson, S., and Villablanca, E.J. (2015). Breast milk and solid food shaping intestinal immunity. *Front. Immunol.* *6*, 1–21.
- Park, J.-M., Jung, C.H., Seo, M., Otto, N.M., Grunwald, D., Kim, K.H., Moriarity, B., Kim, Y.-M., Starker, C., Nho, R.S., et al. (2016). The ULK1 complex mediates MTORC1 signaling to the autophagy initiation machinery via binding and phosphorylating ATG14. *Autophagy* *12*, 547–564.
- Parkes, M., Barrett, J.C., Prescott, N.J., Tremelling, M., Anderson, C.A., Fisher, S.A., Roberts, R.G., Nimmo, E.R., Cummings, F.R., Soars, D., et al. (2007). Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.* *39*, 830–832.
- Pascal, V., Pozuelo, M., Borruel, N., Casellas, F., Campos, D., Santiago, A., Martinez, X., Varela, E., Sarabayrouse, G., Machiels, K., et al. (2017). A microbial signature for Crohn's disease. *Gut* *66*, 813–822.
- Pascucci, L., Coccè, V., Bonomi, A., Ami, D., Ceccarelli, P., Ciusani, E., Viganò, L., Locatelli, A., Sisto, F., Doglia, S.M., et al. (2014). Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: A new approach for drug delivery. *J. Control. Release* *192*, 262–270.
- Pathan, M., Fonseka, P., Chitti, S. V., Kang, T., Sanwlani, R., Van Deun, J., Hendrix, A., and Mathivanan, S. (2019). Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res.* *47*, D516–D519.
- Peck, B.C.E., Weiser, M., Lee, S.E., Gipson, G.R., Iyer, V.B., Sartor, R.B., Herfarth, H.H., Long, M.D., Hansen, J.J., Isaacs, K.L., et al. (2015). MicroRNAs Classify Different Disease Behavior Phenotypes of Crohn's Disease and May Have Prognostic Utility. *Inflamm. Bowel Dis.* *21*, 2178–2187.
- Pekow, J.R., and Kwon, J.H. (2012). MicroRNAs in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *18*, 187–193.
- Pennati, M., Lopergolo, A., Profumo, V., De Cesare, M., Sbarra, S., Valdagni, R., Zaffaroni, N., Gandellini, P., and Folini, M. (2014). miR-205 impairs the autophagic flux and enhances cisplatin cytotoxicity in castration-resistant prostate cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* *87*, 579–597.
- Petersen, C., and Round, J.L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell. Microbiol.* *16*, 1024–1033.
- Peterson, L.W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 141–153.
- Peyrin-Biroulet, L., Standaert-Vitse, A., Branche, J., and Chamailard, M. (2007). IBD serological panels: Facts and perspectives. *Inflamm. Bowel Dis.* *13*, 1561–1566.
- Pierdomenico, M., Cesi, V., Cucchiara, S., Vitali, R., Prete, E., Costanzo, M., Aloï, M., Oliva, S., and Stronati, L. (2016). NOD2 Is Regulated By Mir-320 in Physiological Conditions but this Control Is Altered in Inflamed Tissues of Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *22*, 315–326.
- Pike, K.A., and Tremblay, M.L. (2018). Protein Tyrosine Phosphatases: Regulators of CD4 T Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Front. Immunol.* *9*, 1–14.
- Pilli, M., Arko-Mensah, J., Ponpuak, M., Roberts, E., Master, S., Mandell, M.A., Dupont, N., Ornatowski, W., Jiang, S., Bradfute, S.B., et al. (2012). TBK-1 Promotes Autophagy-Mediated Antimicrobial Defense by Controlling Autophagosome Maturation. *Immunity* *37*, 223–234.
- Pineton de Chambrun, G., Body-Malapel, M., Frey-Wagner, I., Djouina, M., Deknuydt, F., Atrott, K., Esquerre, N., Altare, F., Neut, C., Arrieta, M.C., et al. (2014). Aluminum enhances inflammation and decreases mucosal healing in experimental colitis in mice. *Mucosal Immunol.* *7*, 589–601.
- Polager, S., Ofir, M., and Ginsberg, D. (2008). E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene* *27*, 4860–4864.
- Polajnar, M., Dietz, M.S., Heilemann, M., and Behrends, C. (2017). Expanding the host cell ubiquitylation machinery targeting cytosolic Salmonella. *EMBO Rep.* *18*, 1572–1585.
- Polgar, N., Csongeï, V., Szabo, M., Zambo, V., Melegh, B.I., Sumegi, K., Nagy, G., Tulassay, Z., and Melegh, B. (2012). Investigation of JAK2, STAT3 and CCR6 polymorphisms and their gene-gene interactions in inflammatory bowel disease. *Int. J. Immunogenet.* *39*, 247–252.
- Polytarchou, C., Oikonomopoulos, A., Mahurkar, S., Touroutoglou, A., Koukos, G., Hommes, D.W., and Iliopoulos, D. (2015). Assessment of Circulating MicroRNAs for the Diagnosis and Disease Activity Evaluation in Patients with Ulcerative Colitis by Using the Nanostring Technology. *Inflamm. Bowel Dis.* *21*, 2533–2539.
- Pothoven, K.L., and Schleimer, R.P. (2017). The barrier hypothesis and Oncostatin M: Restoration of epithelial barrier function as a novel therapeutic strategy for the treatment of type 2 inflammatory disease. *Tissue Barriers* *5*, 1–18.
- Pott, J., Kabat, A.M., and Maloy, K.J. (2018). Intestinal Epithelial Cell Autophagy Is Required to Protect against TNF-Induced Apoptosis during Chronic Colitis in Mice. *Cell Host Microbe* *1–12*.
- Prantera, C., Zannoni, F., Scribano, M.L., Berto, E., Andreoli, A., Kohn, A., and Luzi, C. (1996). An antibiotic regimen for the treatment of active Crohn's disease: a randomized, controlled clinical trial of metronidazole plus ciprofloxacin. *Am. J. Gastroenterol.* *91*, 328–332.
- Prescott, N.J., Fisher, S.A., Franke, A., Hampe, J., Onnie, C.M., Soars, D., Bagnall, R., Mirza, M.M., Sanderson, J., Forbes, A., et al. (2007). A Nonsynonymous SNP in ATG16L1 Predisposes to Ileal Crohn's Disease and Is Independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* *132*, 1665–1671.
- Prindiville, T.P., Sheikh, R.A., Cohen, S.H., Tang, Y.J., Cantrell, M.C., and Silva, J. (2000). *Bacteroides fragilis*

enterotoxin gene sequences in patients with inflammatory bowel disease. *Emerg. Infect. Dis.* 6, 171–174.

Proikas-Cezanne, T., Takacs, Z., Donnes, P., and Kohlbacher, O. (2015). WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *J. Cell Sci.* 128, 207–217.

Puente, C., Hendrickson, R.C., and Jiang, X. (2016). Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy. *J. Biol. Chem.* 291, 6026–6035.

Purcell, R. V., Kaakoush, N.O., Mitchell, H.M., Pearson, J.F., and Keenan, J.I. (2018). Gastrointestinal Pathobionts in Pediatric Crohn's Disease Patients. *Int. J. Microbiol.* 2018, 1–5.

Putz, U., Howitt, J., Doan, A., Goh, C.-P., Low, L.-H., Silke, J., and Tan, S.-S. (2012). The Tumor Suppressor PTEN Is Exported in Exosomes and Has Phosphatase Activity in Recipient Cells. *Sci. Signal.* 5, ra70–ra70.

Q

Qiao, Y., Huang, M., Xu, A., Zhao, D., Ran, Z., and Shen, J. (2013). LncRNA DQ786243 affects Treg related CREB and Foxp3 expression in Crohn's disease. *J. Biomed. Sci.* 20, 87.

Quah, B.J.C., and O'Neill, H.C. (2007). Mycoplasma contaminants present in exosome preparations induce polyclonal B cell responses. *J. Leukoc. Biol.* 82, 1070–1082.

Quinton, J.-F., Sendid, B., Reumaux, D., Duthilleul, P., Cortot, A., Grandbastien, B., Charrier, G., Targan, S.R., Colombel, J.-F., and Poulain, D. (1998). Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* 42, 788–791.

R

Raab-Traub, N., and Dittmer, D.P. (2017). Viral effects on the content and function of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 559–572.

Rabizadeh, S., Rhee, K.J., Wu, S., Huso, D., Gan, C.M., Golub, J.E., Wu, X., Zhang, M., and Sears, C.L. (2007). Enterotoxigenic Bacteroides fragilis: A potential instigator of colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 1475–1483.

Radoshevich, L., Murrow, L., Chen, N., Fernandez, E., Roy, S., Fung, C., and Debnath, J. (2010). ATG12 Conjugation to ATG3 Regulates Mitochondrial Homeostasis and Cell Death. *Cell* 142, 590–600.

Ragusa, M., Barbagallo, C., Ciriigliaro, M., Battaglia, R., Brex, D., Caponnetto, A., Barbagallo, D., Di Pietro, C., and Purrello, M. (2017). Asymmetric RNA Distribution among Cells and Their Secreted Exosomes: Biomedical Meaning and Considerations on Diagnostic Applications. *Front. Mol. Biosci.* 4, 1–14.

Ramachandra, L., Qu, Y., Wang, Y., Lewis, C.J., Cobb, B.A., Takatsu, K., Boom, W.H., Dubyak, G.R., and Harding, C. V. (2010). Mycobacterium tuberculosis Synergizes with ATP To Induce Release of Microvesicles and Exosomes Containing Major Histocompatibility Complex Class II Molecules Capable of Antigen Presentation. *Infect. Immun.* 78, 5116–5125.

Raposo, G. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* 183, 1161–1172.

Ravenhill, B.J., Boyle, K.B., von Muhlinen, N., Ellison, C.J., Masson, G.R., Otten, E.G., Foeglein, A., Williams, R., and Randow, F. (2019). The Cargo Receptor NDP52 Initiates Selective Autophagy by Recruiting the ULK Complex to Cytosol-Invading Bacteria. *Mol. Cell* 74, 320–329.e6.

Ravindran, R., Loebbermann, J., Nakaya, H.I., Khan, N., Ma, H., Gama, L., Machiah, D.K., Lawson, B., Hakimpour, P., Wang, Y.C., et al. (2016). The amino acid sensor GCN2 controls gut inflammation by inhibiting inflammasome activation. *Nature* 531, 523–527.

Reinisch, W., Panés, J., Lémann, M., Schreiber, S., Feagan, B., Schmidt, S., Sturmiolo, G.C., Mikhailova, T., Alexeeva, O., Sanna, L., et al. (2008). A Multicenter, Randomized, Double-Blind Trial of Everolimus Versus Azathioprine and Placebo to Maintain Steroid-Induced Remission in Patients With Moderate-to-Severe Active Crohn's Disease. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 2284–2292.

Renault, V.M., Thekkat, P.U., Hoang, K.L., White, J.L., Brady, C.A., Kenzelmann Broz, D., Venturelli, O.S., Johnson, T.M., Oskoui, P.R., Xuan, Z., et al. (2011). The pro-longevity gene FoxO3 is a direct target of the p53 tumor suppressor. *Oncogene* 30, 3207–3221.

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

Riaz Rajoka, M.S., Shi, J., Mehewish, H.M., Zhu, J., Li, Q., Shao, D., Huang, Q., and Yang, H. (2017). Interaction between diet composition and gut microbiota and its impact on gastrointestinal tract health. *Food Sci. Hum. Wellness* 6, 121–130.

Rivière, C., Peyret, P., Parisot, N., Darcha, C., Déchelotte, P.J., Barnich, N., Peyretailade, E., and Boucher, D. (2016). Oral exposure to environmental pollutant benzo[a]pyrene impacts the intestinal epithelium and induces gut microbial shifts in murine model. *Sci. Rep.* 6, 1–11.

Richter, B., Sliter, D.A., Herhaus, L., Stolz, A., Wang, C., Beli, P., Zaffagnini, G., Wild, P., Martens, S., Wagner, S.A., et al. (2016). Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 4039–4044.

Risch, H.A., Lu, L., Kidd, M.S., Wang, J., Zhang, W., Ni, Q., Gao, Y.-T., and Yu, H. (2014). Helicobacter pylori Seropositivities and Risk of Pancreatic Carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 23, 172–178.

Rivas, M.A., Beaudoin, M., Gardet, A., Stevens, C., Sharma, Y., Zhang, C.K., Boucher, G., Ripke, S., Ellinghaus, D., Burt, N., et al. (2011). Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nat. Genet.* 43, 1066–1073.

Rodriguez-Palacios, A., Harding, A., Menghini, P., Himmelman, C., Retuerto, M., Nickerson, K.P., Lam, M.,

- Croniger, C.M., McLean, M.H., Durum, S.K., et al. (2018). The Artificial Sweetener Splenda Promotes Gut Proteobacteria, Dysbiosis, and Myeloperoxidase Reactivity in Crohn's Disease-Like Ileitis. *Inflamm. Bowel Dis.* *24*, 1005–1020.
- Rogala, A.R., Schoenborn, A.A., Fee, B.E., Cantillana, V.A., Joyce, M.J., Gharaibeh, R.Z., Roy, S., Fodor, A.A., Sartor, R.B., Taylor, G.A., et al. (2018). Environmental factors regulate Paneth cell phenotype and host susceptibility to intestinal inflammation in Irgm1-deficient mice. *Dis. Model. Mech.* *11*, dmm031070.
- Rojas-Feria, M., Romero-García, T., Fernández Caballero-Rico, J.Á., Pastor Ramírez, H., Avilés-Recio, M., Castro-Fernandez, M., Chueca Porcuna, N., Romero-Gómez, M., García, F., Grande, L., et al. (2018). Modulation of faecal metagenome in Crohn's disease: Role of microRNAs as biomarkers. *World J. Gastroenterol.* *24*, 5223–5233.
- Rolhion, N., Barnich, N., Claret, L., and Darfeuille-michaud, A. (2005). Strong Decrease in Invasive Ability and Outer Membrane Vesicle Release in Crohn's Escherichia coli Strain LF82 with the yfgL Gene Deleted Strong Decrease in Invasive Ability and Outer Membrane Vesicle Release in Crohn's Disease-Associated Adherent-Inv. *187*, 2286–2296.
- Rolhion, N., Carvalho, F.A., and Darfeuille-Michaud, A. (2007). OmpC and the σE regulatory pathway are involved in adhesion and invasion of the Crohn's disease-associated Escherichia coli strain LF82. *Mol. Microbiol.* *63*, 1684–1700.
- Rolhion, N., Barnich, N., Bringer, M.-A., Glasser, A.-L., Ranc, J., Hebuterne, X., Hofman, P., and Darfeuille-Michaud, A. (2010). Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive Escherichia coli invasion. *Gut* *59*, 1355–1362.
- Rosania, R., Arnim, U. Von, Link, A., Rajilic-Stojanovic, M., Franck, C., Canbay, A., Malfertheiner, P., and Venerito, M. (2018). Helicobacter pylori eradication therapy is not associated with the onset of inflammatory bowel diseases. A case-control study. *J. Gastrointest. Liver Dis.* *27*, 119–125.
- Rosenbluth, J.M., and Pietsenpol, J.A. (2009). mTOR regulates autophagy-associated genes downstream of p73. *Autophagy* *5*, 114–116.
- Rothschild, D., Weissbrod, O., Barkan, E., Kurilshikov, A., Korem, T., Zeevi, D., Costea, P.I., Godneva, A., Kalka, I.N., Bar, N., et al. (2018). Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* *555*, 210–215.
- Rouschop, K.M.A., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J.W., et al. (2010). The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J. Clin. Invest.* *120*, 127–141.
- Roy, S., Esmailniakooshghazi, A., Patnaik, S., Wang, Y., George, S.P., Ahrorov, A., Hou, J.K., Herron, A.J., Sesaki, H., and Khurana, S. (2018). Villin-1 and Gelsolin Regulate Changes in Actin Dynamics That Affect Cell Survival Signaling Pathways and Intestinal Inflammation. *Gastroenterology* *154*, 1405-1420.e2.
- Ruiz, P.A., Morón, B., Becker, H.M., Lang, S., Atrott, K., Spalinger, M.R., Scharl, M., Wojtal, K.A., Fischbeck-Terhalle, A., Frey-Wagner, I., et al. (2017). Titanium dioxide nanoparticles exacerbate DSS-induced colitis: role of the NLRP3 inflammasome. *Gut* *66*, 1216–1224.
- Russell, R.C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H.W., Chang, Y.-Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T.P., Dillin, A., and Guan, K.-L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* *15*, 741–750.
- Ryan, P., Kelly, R.G., Lee, G., Collins, J.K., O'Sullivan, G.C., O'Connell, J., and Shanahan, F. (2004). Bacterial DNA within Granulomas of Patients with Crohn's Disease-Detection by Laser Capture Microdissection and PCR. *Am. J. Gastroenterol.* *99*, 1539–1543.

S

- Sadaghian Sadabad, M., Regeling, A., de Goffau, M.C., Blokzijl, T., Weersma, R.K., Penders, J., Faber, K.N., Harmsen, H.J.M., and Dijkstra, G. (2015). The ATG16L1-T300A allele impairs clearance of pathosymbionts in the inflamed ileal mucosa of Crohn's disease patients. *Gut* *64*, 1546–1552.
- Saha, S., and Khanna, S. (2019). Management of Clostridioides difficile colitis: insights for the gastroenterologist. *Therap. Adv. Gastroenterol.* *12*, 175628481984765.
- Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M.H., Uematsu, S., Yang, B.-G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., et al. (2008). Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* *456*, 264–268.
- Sakiyama, T., Musch, M.W., Ropeleski, M.J., Tsubouchi, H., and Chang, E.B. (2009). Glutamine Increases Autophagy Under Basal and Stressed Conditions in Intestinal Epithelial Cells. *Gastroenterology* *136*, 924-932.e2.
- Samie, M., Lim, J., Verschuere, E., Baughman, J.M., Peng, I., Wong, A., Kwon, Y., Senbabaoglu, Y., Hackney, J.A., Keir, M., et al. (2018). Selective autophagy of the adaptor TRIF regulates innate inflammatory signaling. *Nat. Immunol.* *19*, 246–254.
- Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* *320*, 1496–1501.
- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., and Sabatini, D.M. (2010). Regulator-Rag Complex Targets mTORC1 to the Lysosomal Surface and Is Necessary for Its Activation by Amino Acids. *Cell* *141*, 290–303.
- Sanctuary, M.R., Huang, R.H., Jones, A.A., Luck, M.E., Aherne, C.M., Jedlicka, P., de Zoeten, E.F., and Collins, C.B. (2019). miR-106a deficiency attenuates inflammation in murine IBD models. *Mucosal Immunol.* *12*, 200–211.
- Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Rutgeerts, P., Hanauer, S., Colombel, J.-F., Sands, B.E., Lukas, M., Fedorak, R.N., Lee, S., Bressler, B., et al. (2013). Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *N. Engl. J. Med.* *369*, 711–721.
- Sandborn, W.J., Rutgeerts, P., Gasink, C., Jacobstein, D., Zou, B., Johanns, J., Sands, B.E., Hanauer, S.B., Targan, S., Ghosh, S., et al. (2018). Long-term efficacy and safety of ustekinumab for Crohn's disease through the second year of therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *48*, 65–77.
- Sands, B.E. (2015). Biomarkers of Inflammation in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* *149*, 1275-

1285.e2.

Sands, B.E., Chen, J., Feagan, B.G., Penney, M., Rees, W.A., Danese, S., Higgins, P.D.R., Newbold, P., Faggioni, R., Patra, K., et al. (2017). Efficacy and Safety of MEDI2070, an Antibody Against Interleukin 23, in Patients With Moderate to Severe Crohn's Disease: A Phase 2a Study. *Gastroenterology* *153*, 777–86.e6.

Santangelo, L., Giurato, G., Cicchini, C., Montaldo, C., Mancone, C., Tarallo, R., Battistelli, C., Alonzi, T., Weisz, A., and Tripodi, M. (2016). The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting. *Cell Rep.* *17*, 799–808.

Santeford, A., Wiley, L.A., Park, S., Bamba, S., Nakamura, R., Gdoura, A., Ferguson, T.A., Rao, P.K., Guan, J.L., Saitoh, T., et al. (2016). Impaired autophagy in macrophages promotes inflammatory eye disease. *Autophagy* *12*, 1876–1885.

Sartor, R.B. (2008). Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* *134*, 577–594.

Sartor, R.B., and Wu, G.D. (2017). Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology* *152*, 327–339.e4.

Sasaki, M., Sitaraman, S. V., Babbitt, B.A., Gerner-Smidt, P., Ribot, E.M., Garrett, N., Alpern, J.A., Akyildiz, A., Theiss, A.L., Nusrat, A., et al. (2007). Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab. Investig.* *87*, 1042–1054.

Schaefer, J.S., Attumi, T., Opekun, A.R., Abraham, B., Hou, J., Shelby, H., Graham, D.Y., Streckfus, C., and Klein, J.R. (2015). MicroRNA signatures differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis. *BMC Immunol.* *16*, 5.

Scheidel, J., Amstein, L., Ackermann, J., Dikic, I., and Koch, I. (2016). In Silico Knockout Studies of Xenophagic Capturing of Salmonella. *PLOS Comput. Biol.* *12*, e1005200.

Schirmer, M., Franzosa, E.A., Lloyd-Price, J., McIver, L.J., Schwager, R., Poon, T.W., Ananthakrishnan, A.N., Andrews, E., Barron, G., Lake, K., et al. (2018). Dynamics of metatranscription in the inflammatory bowel disease gut microbiome. *Nat. Microbiol.* *3*, 337–346.

Schmitz, J.M., Tonkonogy, S.L., Dogan, B., Leblond, A., Whitehead, K.J., Kim, S.C., Simpson, K.W., and Sartor, R.B. (2019). Murine Adherent and Invasive *E. coli* Induces Chronic Inflammation and Immune Responses in the Small and Large Intestines of Monoassociated IL-10^{-/-} Mice Independent of Long Polar Fimbriae Adhesin A. *Inflamm. Bowel Dis.* *25*, 875–885.

Schnaith, A., Kashkar, H., Leggio, S.A., Addicks, K., Krönke, M., and Krut, O. (2007). Staphylococcus aureus Subvert Autophagy for Induction of Caspase-independent Host Cell Death. *J. Biol. Chem.* *282*, 2695–2706.

Schnitzer, J.K., Berzel, S., Fajardo-Moser, M., Remer, K.A., and Moll, H. (2010). Fragments of antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes induce protective immunity against *Leishmania major*. *Vaccine* *28*, 5785–5793.

Schönauen, K., Le, N., von Arnim, U., Schulz, C., Malfertheiner, P., and Link, A. (2018). Circulating and Fecal microRNAs as Biomarkers for Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* *24*, 1547–1557.

Schorey, J.S., Cheng, Y., Singh, P.P., and Smith, V.L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep.* *16*, 24–43.

Scudellari, M. (2017). News Feature: Cleaning up the hygiene hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, 1433–1436.

Sears, C.L., Islam, S., Saha, A., Arjumand, M., Alam, N.H., Faruque, A.S.G., Salam, M.A., Shin, J., Hecht, D., Weintraub, A., et al. (2008). Association of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Infection with Inflammatory Diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* *47*, 797–803.

Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., and Doré, J. (2003). Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* *52*, 237–242.

Sendid, B., Colombel, J.F., Jacquinet, P.M., Faille, C., Fruit, J., Cortot, A., Lucidarme, D., Camus, D., and Poulain, D. (1996). Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* *3*, 219–226.

Seo, Y.-K., Jeon, T., Chong, H.K., Biesinger, J., Xie, X., and Osborne, T.F. (2011). Genome-wide Localization of SREBP-2 in Hepatic Chromatin Predicts a Role in Autophagy. *Cell Metab.* *13*, 367–375.

Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., Aencibia, M.G., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., et al. (2011). TFEB Links Autophagy to Lysosomal Biogenesis. *Science* (80-.). *332*, 1429–1433.

Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D.L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M.C., et al. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J.* *31*, 1095–1108.

Sevrin, G., Massier, S., Chassaing, B., Agus, A., Delmas, J., Denizot, J., Billard, E., and Barnich, N. (2018). Adaptation of adherent-invasive *E. coli* to gut environment: Impact on flagellum expression and bacterial colonization ability. *Gut Microbes* *0*, 1–17.

Sha, Y., Rao, L., Settembre, C., Ballabio, A., and Eissa, N.T. (2017). *STUB1* regulates TFEB-induced autophagy-lysosome pathway. *EMBO J.* *36*, 2544–2552.

Shah, A., Talley, N.J., Walker, M., Koloski, N., Morrison, M., Burger, D., Andrews, J.M., McGuckin, M., Jones, M., and Holtmann, G. (2017). Is There a Link Between *H. Pylori* and the Epidemiology of Crohn's Disease? *Dig. Dis. Sci.* *62*, 2472–2480.

Shang, L., Chen, S., Du, F., Li, S., Zhao, L., and Wang, X. (2011). Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 4788–4793.

Shao, B.-Z., Wei, W., Ke, P., Xu, Z.-Q., Zhou, J.-X., and Liu, C. (2014). Activating Cannabinoid Receptor 2 Alleviates Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Via Activation of Autophagy and Inhibiting NLRP3 Inflammation. *CNS Neurosci. Ther.* *20*, 1021–1028.

Shapiro, J.M., Subedi, S., and LeLeiko, N.S. (2016). Inflammatory Bowel Disease. *Pediatr. Rev.* *37*, 337–347.

Shaw, J., Yurkova, N., Zhang, T., Gang, H., Aguilar, F., Weidman, D., Scramstad, C., Weisman, H., and Kirshenbaum, L.A. (2008). Antagonism of E2F-1 regulated Bnip3 transcription by NF- κ B is essential for basal cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 20734–20739.

Shaw, S.Y., Blanchard, J.F., and Bernstein, C.N. (2010). Association between the use of antibiotics in the first year

of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* *105*, 2687–2692.

Shawki, A., and McCole, D.F. (2017). Mechanisms of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Cmgh* *3*, 41–50.

Shears, R.K., Bancroft, A.J., Hughes, G.W., Grecis, R.K., and Thornton, D.J. (2018). Extracellular vesicles induce protective immunity against *Trichuris muris*. *Parasite Immunol.* *40*, e12536.

Shen, Y., Torchia, M.L.G., Lawson, G.W., Karp, C.L., Ashwell, J.D., and Mazmanian, S.K. (2012). Outer Membrane Vesicles of a Human Commensal Mediate Immune Regulation and Disease Protection. *Cell Host Microbe* *12*, 509–520.

Sheng, Z., Ma, L., Sun, J.E., Zhu, L.J., and Green, M.R. (2011). BCR-ABL suppresses autophagy through ATF5-mediated regulation of mTOR transcription. *Blood* *118*, 2840–2848.

Shi, C., Shenderov, K., Huang, N., Kabat, J., Abu-Asab, M., Fitzgerald, K.A., Sher, A., and Kehrl, J.H. (2012). Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat. Immunol.* *13*, 255–263.

Shimoda, A., Ueda, K., Nishiumi, S., Murata-Kamiya, N., Mukai, S., Sawada, S., Azuma, T., Hatakeyama, M., and Akiyoshi, K. (2016). Exosomes as nanocarriers for systemic delivery of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. *Sci. Rep.* *6*, 18346.

Shoji-Kawata, S., Sumpter, R., Leveno, M., Campbell, G.R., Zou, Z., Kinch, L., Wilkins, A.D., Sun, Q., Pallauf, K., MacDuff, D., et al. (2013). Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature* *494*, 201–206.

Shtam, T.A., Kovalev, R.A., Varfolomeeva, E., Makarov, E.M., Kil, Y. V., and Filatov, M. V (2013). Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells in vitro. *Cell Commun. Signal.* *11*, 88.

Shurtleff, M.J., Temoche-Diaz, M.M., Karfilis, K. V, Ri, S., and Schekman, R. (2016). Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *Elife* *5*, 1–23.

Sicard, J.-F., Vogeleer, P., Le Bihan, G., Rodriguez Olivera, Y., Beaudry, F., Jacques, M., and Harel, J. (2018). N-Acetyl-glucosamine influences the biofilm formation of *Escherichia coli*. *Gut Pathog.* *10*, 26.

Da Silva, C., Wagner, C., Bonnardel, J., Gorvel, J.P., and Lelouard, H. (2017). The Peyer's patch mononuclear phagocyte system at steady state and during infection. *Front. Immunol.* *8*.

Simonsen, K.T., Nielsen, G., Bjerrum, J.V., Kruse, T., Kallipolitis, B.H., and Møller-Jensen, J. (2011). A Role for the RNA Chaperone Hfq in Controlling Adherent-Invasive *Escherichia coli* Colonization and Virulence. *PLoS One* *6*, e16387.

Singh, P.P., LeMaire, C., Tan, J.C., Zeng, E., and Schorey, J.S. (2011). Exosomes Released from *M.tuberculosis* Infected Cells Can Suppress IFN- γ Mediated Activation of Naïve Macrophages. *PLoS One* *6*, e18564.

Singh, P.P., Smith, V.L., Karakousis, P.C., and Schorey, J.S. (2012). Exosomes Isolated from Mycobacteria-Infected Mice or Cultured Macrophages Can Recruit and Activate Immune Cells In Vitro and In Vivo. *J. Immunol.* *189*, 777–785.

Singh, P.P., Li, L., and Schorey, J.S. (2015). Exosomal RNA from Mycobacterium tuberculosis -Infected Cells Is Functional in Recipient Macrophages. *Traffic* *16*, 555–571.

Singh, S.B., Davis, A.S., Taylor, G.A., and Deretic, V. (2006). Human IRGM Induces Autophagy to Eliminate Intracellular Mycobacteria. *Science* (80-.). *313*, 1438–1441.

Singh, U.P., Murphy, A.E., Enos, R.T., Shamran, H.A., Singh, N.P., Guan, H., Hegde, V.L., Fan, D., Price, R.L., Taub, D.D., et al. (2014). miR-155 deficiency protects mice from experimental colitis by reducing T helper type 1/type 17 responses. *Immunology* *143*, 478–489.

Sipponen, T., Turunen, U., Lautenschlager, I., Nieminen, U., Arola, J., and Halme, L. (2011). Human herpesvirus 6 and cytomegalovirus in ileocolonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* *46*, 1324–1333.

Sivanesan, D., Beauchamp, C., Quinou, C., Lee, J., Lesage, S., Chemtob, S., Rioux, J.D., and Michnick, S.W. (2016). IL23R (Interleukin 23 Receptor) variants protective against inflammatory bowel diseases (IBD) display loss of function due to impaired protein stability and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* *291*, 8673–8685.

Sivignon, A., De Vallée, A., Barnich, N., Denizot, J., Darcha, C., Pignède, G., Vandekerckove, P., and Darfeuille-Michaud, A. (2015a). *Saccharomyces cerevisiae* CNCMI-3856 prevents colitis induced by AIEC bacteria in the transgenic mouse model mimicking Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *21*, 276–286.

Sivignon, A., Yan, X., Alvarez Dorta, D., Bonnet, R., Bouckaert, J., Fleury, E., Bernard, J., Gouin, S.G., Darfeuille-Michaud, A., and Barnich, N. (2015b). Development of Heptylmannoside-Based Glycoconjugate Antiadhesive Compounds against Adherent-Invasive *Escherichia coli* Bacteria Associated with Crohn's Disease. *MBio* *6*, 1–9.

Skokos, D., Botros, H.G., Demeure, C., Morin, J., Peronet, R., Birkenmeier, G., Boudaly, S., and Mécheri, S. (2003). Mast Cell-Derived Exosomes Induce Phenotypic and Functional Maturation of Dendritic Cells and Elicit Specific Immune Responses In Vivo. *J. Immunol.* *170*, 3037–3045.

Skotland, T., Sandvig, K., and Llorente, A. (2017). Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog. Lipid Res.* *66*, 30–41.

Skotland, T., Hessvik, N.P., Sandvig, K., and Llorente, A. (2019). Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *J. Lipid Res.* *60*, 9–18.

van der Sloot, K.W.J., Amini, M., Peters, V., Dijkstra, G., and Alizadeh, B.Z. (2017). Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* *23*, 1499–1509.

Smith, A.M., Sewell, G.W., Levine, A.P., Chew, T.S., Dunne, J., O'Shea, N.R., Smith, P.J., Harrison, P.J., Macdonald, C.M., Bloom, S.L., et al. (2015). Disruption of macrophage pro-inflammatory cytokine release in Crohn's disease is associated with reduced optineurin expression in a subset of patients. *Immunology* *144*, 45–55.

Smith, E.J., Thompson, A.P., O'Driscoll, A., and Clarke, D.J. (2013). Pathogenesis of adherent-invasive *Escherichia coli*. *Future Microbiol.* *8*, 1289–1300.

Smith, V.L., Cheng, Y., Bryant, B.R., and Schorey, J.S. (2017). Exosomes function in antigen presentation during an in vivo *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Sci. Rep.* *7*, 1–12.

Soares Martins, T., Catita, J., Martins Rosa, I., A. B. da Cruz e Silva, O., and Henriques, A.G. (2018). Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches. *PLoS One* *13*, e0198820.

- Sobolewska-Włodarczyk, A., Włodarczyk, M., Szemraj, J., Stec-Michalska, K., Fichna, J., and Wiśniewska-Jarosińska, M. (2016). Circadian rhythm abnormalities - Association with the course of inflammatory bowel disease. *Pharmacol. Reports* 68, 847–851.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., et al. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 16731–16736.
- Sokol, H., Conway, K.L., Zhang, M., Choi, M., Morin, B., Cao, Z., Villablanca, E.J., Li, C., Wijmenga, C., Yun, S.H., et al. (2013). Card9 mediates intestinal epithelial cell restitution, t-helper 17 responses, and control of bacterial infection in mice. *Gastroenterology* 145.
- Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H.-P., Jegou, S., Landman, C., Cohen, D., Liguori, G., Bourrier, A., Nion-Larmurier, I., et al. (2017). Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* 66, 1039–1048.
- Somineni, H.K., Venkateswaran, S., Kilaru, V., Marigorta, U.M., Mo, A., Okou, D.T., Kellermayer, R., Mondal, K., Cobb, D., Walters, T.D., et al. (2019). Blood-Derived DNA Methylation Signatures of Crohn Disease and Severity of Intestinal Inflammation. *Gastroenterology* 1–12.
- Song, T., Su, H., Yin, W., Wang, L., and Huang, R. (2019). Acetylation modulates <sc>LC</sc> 3 stability and cargo recognition. *FEBS Lett.* 593, 414–422.
- Sonnenberg, A. (2009). Demographic Characteristics of Hospitalized IBD Patients. *Dig. Dis. Sci.* 54, 2449–2455.
- Sorbara, M.T., Foerster, E.G., Tsalikis, J., Abdel-Nour, M., Mangiapane, J., Sirluck-Schroeder, I., Tattoli, I., van Dalen, R., Iseman, D.E., Rohde, J.R., et al. (2018). Complement C3 Drives Autophagy-Dependent Restriction of Cyto-invasive Bacteria. *Cell Host Microbe* 23, 644–652.e5.
- Soubières, A.A. (2016). Emerging role of novel biomarkers in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* 7, 41.
- de Souza, P.R., Guimarães, F.R., Sales-Campos, H., Bonfá, G., Nardini, V., Chica, J.E.L., Turato, W.M., Silva, J.S., Zamboni, D.S., and Cardoso, C.R. de B. (2018). Absence of NOD2 receptor predisposes to intestinal inflammation by a deregulation in the immune response in hosts that are unable to control gut dysbiosis. *Immunobiology* 223, 577–585.
- Spalinger, M.R., Lang, S., Gottier, C., Dai, X., Rawlings, D.J., Chan, A.C., Rogler, G., and Scharl, M. (2017). PTPN22 regulates NLRP3-mediated IL1B secretion in an autophagy-dependent manner. *Autophagy* 13, 1590–1601.
- Spalinger, M.R., Manzini, R., Hering, L., Riggs, J.B., Gottier, C., Lang, S., Atrott, K., Fettelschoss, A., Olomski, F., Kündig, T.M., et al. (2018). PTPN22 Regulates Inflammasome Activation and Controls Onset of Intestinal Inflammation and Colon Cancer. *Cell Rep.* 22, 1835–1848.
- Stahl, P.D., and Raposo, G. (2019). Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis. *Physiology* 34, 169–177.
- Standaert-Vitse, A., Jouault, T., Vandewalle, P., Mille, C., Seddik, M., Sendid, B., Mallet, J.M., Colombel, J.F., and Poulain, D. (2006). *Candida albicans* Is an Immunogen for Anti-Saccharomyces cerevisiae Antibody Markers of Crohn's Disease. *Gastroenterology* 130, 1764–1775.
- Standaert-Vitse, A., Sendid, B., Joossens, M., François, N., Vandewalle-El Khoury, P., Branche, J., Van Kruiningen, H., Jouault, T., Rutgeerts, P., Gower-Rousseau, C., et al. (2009). *Candida albicans* Colonization and ASCA in Familial Crohn's Disease. *Am. J. Gastroenterol.* 104, 1745–1753.
- Statello, L., Maugeri, M., Garre, E., Nawaz, M., Wahlgren, J., Papadimitriou, A., Lundqvist, C., Lindfors, L., Collén, A., Sunnerhagen, P., et al. (2018). Identification of RNA-binding proteins in exosomes capable of interacting with different types of RNA: RBP-facilitated transport of RNAs into exosomes. *PLoS One* 13, e0195969.
- Sterzenbach, U., Putz, U., Low, L.-H., Silke, J., Tan, S.-S., and Howitt, J. (2017). Engineered Exosomes as Vehicles for Biologically Active Proteins. *Mol. Ther.* 25, 1269–1278.
- Stevens, C., Henderson, P., Nimmo, E.R., Soares, D.C., Dogan, B., Simpson, K.W., Barrett, J.C., Wilson, D.C., and Satsangi, J. (2013). The intermediate filament protein, vimentin, is a regulator of NOD2 activity. *Gut* 62, 695–707.
- Stewart, G.R., Wilkinson, K.A., Newton, S.M., Sullivan, S.M., Neyrolles, O., Wain, J.R., Patel, J., Pool, K.-L., Young, D.B., and Wilkinson, R.J. (2005). Effect of Deletion or Overexpression of the 19-Kilodalton Lipoprotein Rv3763 on the Innate Response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 73, 6831–6837.
- Strofilas, A., Lagoudianakis, E.E., Seretis, C., Pappas, A., Koronakis, N., Keramidaris, D., Koukoutsis, I., Chrysikos, I., Manouras, I., and Manouras, A. (2012). Association of helicobacter pylori infection and colon cancer. *J. Clin. Med. Res.* 4, 172–176.
- Su, H., Yang, F., Wang, Q., Shen, Q., Huang, J., Peng, C., Zhang, Y., Wan, W., Wong, C.C.L., Sun, Q., et al. (2017). VPS34 Acetylation Controls Its Lipid Kinase Activity and the Initiation of Canonical and Non-canonical Autophagy. *Mol. Cell* 67, 907–921.e7.
- Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B., and Record, M. (2007). Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* 89, 205–212.
- Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., et al. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J. Lipid Res.* 51, 2105–2120.
- Summers, R.W., Elliott, D.E., Urban, J.F., Thompson, R.A., and Weinstock, J. V. (2005). *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: A randomized controlled trial. *Gastroenterology* 128, 825–832.
- Sun, C.-M., Wu, J., Zhang, H., Shi, G., and Chen, Z.-T. (2017). Circulating miR-125a but not miR-125b is decreased in active disease status and negatively correlates with disease severity as well as inflammatory cytokines in patients with Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* 23, 7888–7898.
- Sun, D., Zhuang, X., Xiang, X., Liu, Y., Zhang, S., Liu, C., Barnes, S., Grizzle, W., Miller, D., and Zhang, H.-G. (2010). A Novel Nanoparticle Drug Delivery System: The Anti-inflammatory Activity of Curcumin Is Enhanced When Encapsulated in Exosomes. *Mol. Ther.* 18, 1606–1614.

- Sun, T., Li, X., Zhang, P., Chen, W.-D., Zhang, H., Li, D.-D., Deng, R., Qian, X.-J., Jiao, L., Ji, J., et al. (2015). Acetylation of Beclin 1 inhibits autophagosome maturation and promotes tumour growth. *Nat. Commun.* *6*, 7215.
- Sun, Z., Shi, K., Yang, S., Liu, J., Zhou, Q., Wang, G., Song, J., Li, Z., Zhang, Z., and Yuan, W. (2018). Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications. *Mol. Cancer* *17*, 1–19.
- Sutherland, L., Singleton, J., Sessions, J., Hanauer, S., Krawitt, E., Rankin, G., Summers, R., Mekhjian, H., Greenberger, N., and Kelly, M. (1991). Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut* *32*, 1071–1075.
- Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M., et al. (2002). Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *122*, 44–54.
- Swidsinski, A., Weber, J., Loening-Baucke, V., Hale, L.P., and Lochs, H. (2005). Spatial Organization and Composition of the Mucosal Flora in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *J. Clin. Microbiol.* *43*, 3380–3389.
- Swidsinski, A., Ung, V., Sydora, B.C., Loening-Baucke, V., Doerffel, Y., Verstraelen, H., and Fedorak, R.N. (2009). Bacterial Overgrowth and Inflammation of Small Intestine After Carboxymethylcellulose Ingestion in Genetically Susceptible Mice. *Inflamm. Bowel Dis.* *15*, 359–364.
- Szűcs, D., Béres, N.J., Rokonay, R., Boros, K., Borka, K., Kiss, Z., Arató, A., Szabó, A.J., Vannay, Á., Sziksz, E., et al. (2016). Increased duodenal expression of miR-146a and -155 in pediatric Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* *22*, 6027.

T

- Tabaqchali, S., O'Donoghue, D.P., and Bettelheim, K.A. (1978). Escherichia coli antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* *19*, 108–113.
- Takagi, T., Naito, Y., Mizushima, K., Hirata, I., Yagi, N., Tomatsuri, N., Ando, T., Oyamada, Y., Isozaki, Y., Hongo, H., et al. (2010). Increased expression of microRNA in the inflamed colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *25*, S129–S133.
- Takahama, M., Akira, S., and Saitoh, T. (2018). Autophagy limits activation of the inflammasomes. *Immunol. Rev.* *281*, 62–73.
- Takahashi, Y., Meyerkord, C.L., Hori, T., Runkle, K., Fox, T.E., Kester, M., Loughran, T.P., and Wang, H.-G. (2011). Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy* *7*, 61–73.
- Tan, J.M.J., Mellouk, N., Osborne, S.E., Ammendolia, D.A., Dyer, D.N., Li, R., Brunen, D., van Rijn, J.M., Huang, J., Czuczman, M.A., et al. (2018). An ATG16L1-dependent pathway promotes plasma membrane repair and limits Listeria monocytogenes cell-to-cell spread. *Nat. Microbiol.* *3*, 1472–1485.
- Tan, S., Shi, H., Ba, M., Lin, S., Tang, H., Zeng, X., and Zhang, X. (2016). miR-409-3p sensitizes colon cancer cells to oxaliplatin by inhibiting Beclin-1-mediated autophagy. *Int. J. Mol. Med.* *37*, 1030–1038.
- Tang, B., Li, N., Gu, J., Li, Q., Zhuang, Y., Fang, Y., Yu, B., Wang, H., Zhang, J., Xie, Q., et al. (2012). Supplemental Material to : and Xuhu Mao Compromised autophagy by MIR30B bene ts the intracellular survival of Helicobacter pylori. *8*, 1045–1057.
- Tang, W.-J., Peng, K.-Y., Tang, Z.-F., Wang, Y.-H., Xue, A.-J., and Huang, Y. (2018). MicroRNA-15a - cell division cycle 42 signaling pathway in pathogenesis of pediatric inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* *24*, 5234–5245.
- Tanida, I., Mizushima, N., Kiyooka, M., Ohsumi, M., Ueno, T., Ohsumi, Y., and Kominami, E. (1999). Apg7p/Cvt2p: A Novel Protein-activating Enzyme Essential for Autophagy. *Mol. Biol. Cell* *10*, 1367–1379.
- Tawfik, A., Flanagan, P.K., and Campbell, B.J. (2014). Escherichia coli-host macrophage interactions in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* *20*, 8751–8763.
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., and Amigorena, S. (2001). Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *J. Immunol.* *166*, 7309–7318.
- Théry, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002a). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 569–579.
- Théry, C., Duban, L., Segura, E., Véron, P., Lantz, O., and Amigorena, S. (2002b). Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Immunol.* *3*, 1156–1162.
- Théry, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 581–593.
- Thomas, M.P., Liu, X., Whangbo, J., McCrossan, G., Sanborn, K.B., Basar, E., Walch, M., and Lieberman, J. (2015). Apoptosis Triggers Specific, Rapid, and Global mRNA Decay with 3' Uridylated Intermediates Degraded by DIS3L2. *Cell Rep.* *11*, 1079–1089.
- Thorsvik, S., Damås, J.K., Granlund, A. vB, Flo, T.H., Bergh, K., Østvik, A.E., and Sandvik, A.K. (2017). Fecal neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker for inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *32*, 128–135.
- Thurston, T.L., Boyle, K.B., Allen, M., Ravenhill, B.J., Karpiyevich, M., Bloor, S., Kaul, A., Noad, J., Foeglein, A., Matthews, S.A., et al. (2016). Recruitment of TBK1 to cytosol-invading Salmonella induces WIPI2-dependent antibacterial autophagy. *EMBO J.* *35*, 1779–1792.
- Thurston, T.L.M., Ryzhakov, G., Bloor, S., von Muhlinen, N., and Randow, F. (2009). The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat. Immunol.* *10*, 1215–1221.
- Thurston, T.L.M., Wandel, M.P., von Muhlinen, N., Foeglein, Á., and Randow, F. (2012). Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* *482*, 414–418.
- Tian, C., Kabi, A., and McDonald, C. (2013). Role of Autophagy-Related Genes in the Pathology of Inflammatory Bowel Disease. In *ELS*, (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), pp. 1–8.

- Tian, Y., Li, S., Song, J., Ji, T., Zhu, M., Anderson, G.J., Wei, J., and Nie, G. (2014). A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* 35, 2383–2390.
- Tian, Y., Xu, J., Li, Y., Zhao, R., Du, S., Lv, C., Wu, W., Liu, R., Sheng, X., Song, Y., et al. (2019). MicroRNA-31 Reduces Inflammatory Signaling and Promotes Regeneration in Colon Epithelium, and Delivery of Mimics in Microspheres Reduces Colitis in Mice. *Gastroenterology* 1–16.
- Tiwana, H., Natt, R.S., Benitez-Brito, R., Shah, S., Wilson, C., Bridger, S., Harbord, M., Sarner, M., and Ebringer, A. (2001). Correlation between the immune responses to collagens type I, III, IV and V and *Klebsiella pneumoniae* in patients with Crohn's disease and ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 40, 15–23.
- Tong, J., Yan, X., and Yu, L. (2010). The late stage of autophagy: Cellular events and molecular regulation. *Protein Cell* 1, 907–915.
- Tontini, G.E. (2015). Differential diagnosis in inflammatory bowel disease colitis: State of the art and future perspectives. *World J. Gastroenterol.* 21, 21.
- Török, H.-P., Glas, J., Tonenchi, L., Bruennler, G., Folwaczny, M., and Folwaczny, C. (2004). Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. *Gastroenterology* 127, 365–366.
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F., and Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *Lancet* 389, 1741–1755.
- Tosar, J.P., Gambaro, F., Sanguinetti, J., Bonilla, B., Witwer, K.W., and Cayota, A. (2015). Assessment of small RNA sorting into different extracellular fractions revealed by high-throughput sequencing of breast cell lines. *Nucleic Acids Res.* 43, 5601–5616.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B., and Simons, M. (2008). Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science* (80-.). 319, 1244–1247.
- Travassos, L.H., Carneiro, L.A.M., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y., Magalhães, J.G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., et al. (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* 11, 55–62.
- Tsaprioni, L.G., Ito, K., Powell, J.J., Adcock, I.M., and Pouchard, N. (2011). Differential patterns of histone acetylation in inflammatory bowel diseases. *J. Inflamm.* 8, 1.
- Tschurtschenthaler, M., Adolph, T.E., Ashcroft, J.W., Niederreiter, L., Bharti, R., Saveljeva, S., Bhattacharyya, J., Flak, M.B., Shih, D.Q., Fuhler, G.M., et al. (2017). Defective ATG16L1-mediated removal of IRE1 α drives Crohn's disease-like ileitis. *J. Exp. Med.* 214, 401–422.
- Tsuboi, K., Nishitani, M., Takakura, A., Imai, Y., Komatsu, M., and Kawashima, H. (2015). Autophagy Protects against Colitis by the Maintenance of Normal Gut Microflora and Secretion of Mucus. *J. Biol. Chem.* 290, 20511–20526.
- Tsuchiya, M., Ogawa, H., Koujin, T., Mori, C., Osakada, H., Kobayashi, S., Hiraoka, Y., and Haraguchi, T. (2018). p62/SQSTM1 promotes rapid ubiquitin conjugation to target proteins after endosome rupture during xenophagy. *FEBS Open Bio* 8, 470–480.
- Tsukada, M., and Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 333, 169–174.
- Tumbarello, D.A., Waxse, B.J., Arden, S.D., Bright, N.A., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2012). Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nat. Cell Biol.* 14, 1024–1035.
- Tumbarello, D.A., Manna, P.T., Allen, M., Bycroft, M., Arden, S.D., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2015). The Autophagy Receptor TAX1BP1 and the Molecular Motor Myosin VI Are Required for Clearance of *Salmonella Typhimurium* by Autophagy. *PLoS Pathog.* 11, 1–26.
- Turner, J.R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 799–809.
- Tursi, A. (2006). Onset of Crohn's disease after *Helicobacter pylori* eradication. *Inflamm. Bowel Dis.* 12, 1008–1009.
- Tyakht, A. V., Manolov, A.I., Kanygina, A. V., Ischenko, D.S., Kovarsky, B.A., Popenko, A.S., Pavlenko, A. V., Elizarova, A. V., Rakitina, D. V., Baikova, J.P., et al. (2018). Genetic diversity of *Escherichia coli* in gut microbiota of patients with Crohn's disease discovered using metagenomic and genomic analyses. *BMC Genomics* 19, 1–14.

U

- Uderner, M., Perriot, J., Cosnes, J., Beau, P., Peiffer, G., and Meurice, J.-C. (2016). Tabagisme, sevrage tabagique et maladie de Crohn. *Presse Med.* 45, 390–402.
- Ungaro, F., Massimino, L., Furfaro, F., Rimoldi, V., Peyrin-Biroulet, L., D'Alessio, S., and Danese, S. (2019). Metagenomic analysis of intestinal mucosa revealed a specific eukaryotic gut virome signature in early-diagnosed inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* 10, 149–158.
- Utsugi-Kobukai, S., Fujimaki, H., Hotta, C., Nakazawa, M., and Minami, M. (2003). MHC class I-mediated exogenous antigen presentation by exosomes secreted from immature and mature bone marrow derived dendritic cells. *Immunol. Lett.* 89, 125–131.

V

- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659.
- Vanhove, W., Nys, K., Arijis, I., Cleynen, I., Noben, M., De Schepper, S., Van Assche, G., Ferrante, M., and Vermeire, S. (2018). Biopsy-derived Intestinal Epithelial Cell Cultures for Pathway-based Stratification of Patients With Inflammatory

Bowel Disease. *J. Crohn's Colitis* 12, 178–187.

Väre, P.O., Heikius, B., Silvennoinen, J.A., Karttunen, R., Niemelä, S.E., Lehtola, J.K., and Karttunen, T.J. (2001). Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in inflammatory bowel disease: is *Helicobacter pylori* infection a protective factor? *Scand. J. Gastroenterol.* 36, 1295–1300.

Vaughn, B.P., Vatanen, T., Allegretti, J.R., Bai, A., Xavier, R.J., Korzenik, J., Gevers, D., Ting, A., Robson, S.C., and Moss, A.C. (2016). Increased Intestinal Microbial Diversity Following Fecal Microbiota Transplant for Active Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 22, 2182–2190.

Vazeille, E., Bringer, M.-A., Gardarin, A., Chambon, C., Becker-Pauly, C., Pender, S.L.F., Jakob, C., Müller, S., Lottaz, D., and Darfeuille-Michaud, A. (2011). Role of Meprins to Protect Ileal Mucosa of Crohn's Disease Patients from Colonization by Adherent-Invasive *E. coli*. *PLoS One* 6, e21199.

Vazeille, E., Buisson, A., Bringer, M.A., Goutte, M., Ouchchane, L., Hugot, J.P., de Vallée, A., Barnich, N., Bommelaer, G., and Darfeuille-Michaud, A. (2015). Monocyte-derived macrophages from Crohn's disease patients are impaired in the ability to control intracellular adherent-invasive *Escherichia coli* and exhibit disordered cytokine secretion profile. *J. Crohn's Colitis* 9, 410–420.

Vazeille, E., Chassaing, B., Buisson, A., Dubois, A., De Vallée, A., Billard, E., Neut, C., Bommelaer, G., Colombel, J.F., Barnich, N., et al. (2016). GpA Factor Supports Colonization of Peyer's Patches by Crohn's Disease-associated *Escherichia coli*. *Inflamm. Bowel Dis.* 22, 68–81.

Veerappan, G.R., Betteridge, J., and Young, P.E. (2012). Probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 14, 324–333.

Venthram, N.T., Kennedy, N.A., Adams, A.T., Kalla, R., Heath, S., O'Leary, K.R., Drummond, H., Wilson, D.C., Gut, I.G., Nimmo, E.R., et al. (2016). Integrative epigenome-wide analysis demonstrates that DNA methylation may mediate genetic risk in inflammatory bowel disease. *Nat. Commun.* 7, 13507.

Verdier, J., Breunig, I.R., Ohse, M.C., Roubrocks, S., Kleinfeld, S., Roy, S., Streetz, K., Trautwein, C., Roderburg, C., and Sellge, G. (2019). Faecal Micro-RNAs in Inflammatory Bowel Diseases. *J. Crohn's Colitis* 1–8.

Verlhac, P., Grégoire, I.P., Azocar, O., Petkova, D.S., Baguet, J., Viret, C., and Faure, M. (2015). Autophagy receptor NDP52 regulates pathogen-containing autophagosome maturation. *Cell Host Microbe* 17, 515–525.

Viaud, S., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., André, F., Novault, S., Escudier, B., Robert, C., Caillat-Zucman, S., Tursz, T., et al. (2009). Dendritic Cell-Derived Exosomes Promote Natural Killer Cell Activation and Proliferation: A Role for NKG2D Ligands and IL-15R α . *PLoS One* 4, e4942.

Viennois, E., Zhao, Y., Han, M.K., Xiao, B., Zhang, M., Prasad, M., Wang, L., and Merlin, D. (2017). Serum miRNA signature diagnoses and discriminates murine colitis subtypes and predicts ulcerative colitis in humans. *Sci. Rep.* 7, 2520.

Vignal, C., Pichavant, M., Alleman, L.Y., Djouina, M., Dingreville, F., Perdrix, E., Waxin, C., Ouali Alami, A., Gower-Rousseau, C., Desreumaux, P., et al. (2017). Effects of urban coarse particles inhalation on oxidative and inflammatory parameters in the mouse lung and colon. *Part. Fibre Toxicol.* 14, 46.

Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., and Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* 4, 1–10.

Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Mittelbrunn, M., Fernández-Delgado, I., Torralba, D., Moreno-Gonzalo, O., Baldanta, S., Enrich, C., Guerra, S., and Sánchez-Madrid, F. (2016). ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nat. Commun.* 7, 13588.

van der Vlist, E.J., Arkesteijn, G.J.A., van de Lest, C.H.A., Stoorvogel, W., Nolte-'t Hoen, E.N.M., and Wauben, M.H.M. (2012). CD4 + T cell activation promotes the differential release of distinct populations of nanosized vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 1, 18364.

Vong, L., Yeung, C.W., Pinnell, L.J., and Sherman, P.M. (2016). Adherent-invasive *Escherichia coli* Exacerbates Antibiotic-associated Intestinal Dysbiosis and Neutrophil Extracellular Trap Activation. *Inflamm. Bowel Dis.* 22, 42–54.

W

Wagner, J., Maksimovic, J., Farries, G., Sim, W.H., Bishop, R.F., Cameron, D.J., Catto-Smith, A.G., and Kirkwood, C.D. (2013). Bacteriophages in Gut Samples From Pediatric Crohn's Disease Patients. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 1598–1608.

Wahlgren, J., Karlson, T.D.L., Glader, P., Telemo, E., and Valadi, H. (2012a). Activated Human T Cells Secrete Exosomes That Participate in IL-2 Mediated Immune Response Signaling. *PLoS One* 7, e49723.

Wahlgren, J., Karlson, T.D.L., Brisslert, M., Vaziri Sani, F., Telemo, E., Sunnerhagen, P., and Valadi, H. (2012b). Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Res.* 40, e130–e130.

Wai, S.N., Takade, A., and Amako, K. (1995). The Release of Outer Membrane Vesicles from the Strains of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol. Immunol.* 39, 451–456.

Wan, G., Xie, W., Liu, Z., Xu, W., Lao, Y., Huang, N., Cui, K., Liao, M., He, J., Jiang, Y., et al. (2014). Hypoxia-induced MIR155 is a potent autophagy inducer by targeting multiple players in the MTOR pathway. *Autophagy* 10, 70–79.

Wang, H., Chao, K., Ng, S.C., Bai, A.H., Yu, Q., Yu, J., Li, M., Cui, Y., Chen, M., Hu, J.-F., et al. (2016a). Pro-inflammatory miR-223 mediates the cross-talk between the IL23 pathway and the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Genome Biol.* 17, 58.

Wang, H., Zhang, S., Yu, Q., Yang, G., Guo, J., Li, M., Zeng, Z., He, Y., Chen, B., and Chen, M. (2016b). Circulating MicroRNA223 is a New Biomarker for Inflammatory Bowel Disease. *Medicine (Baltimore)*. 95, e2703.

Wang, H., Zhang, X., Zuo, Z., Zhang, Q., Pan, Y., Zeng, B., Li, W., Wei, H., and Liu, Z. (2017a). Rip2 Is Required for Nod2-Mediated Lysozyme Sorting in Paneth Cells. *J. Immunol.* 1601583.

- Wang, J., Deng, Z., Wang, Z., Wu, J., Gu, T., Jiang, Y., and Li, G. (2016c). MicroRNA-155 in exosomes secreted from helicobacter pylori infection macrophages immunomodulates inflammatory response. *Am. J. Transl. Res.* 8, 3700–3709.
- Wang, R.C., Wei, Y., An, Z., Zou, Z., Xiao, G., Bhagat, G., White, M., Reichelt, J., and Levine, B. (2012a). Akt-Mediated Regulation of Autophagy and Tumorigenesis Through Beclin 1 Phosphorylation. *Science* (80-.). 338, 956–959.
- Wang, S.-L., Wang, Z.-R., and Yang, C.-Q. (2012b). Meta-analysis of broad-spectrum antibiotic therapy in patients with active inflammatory bowel disease. *Exp. Ther. Med.* 4, 1051–1056.
- Wang, S., Xu, M., Wang, W., Cao, X., Piao, M., Khan, S., Yan, F., Cao, H., and Wang, B. (2016d). Systematic review: Adverse events of fecal Microbiota transplantation. *PLoS One* 11, 1–24.
- Wang, Y., Tian, J., Tang, X., Rui, K., Tian, X., Ma, J., Ma, B., Xu, H., Lu, L., and Wang, S. (2016e). Exosomes released by granulocytic myeloid-derived suppressor cells attenuate DSS-induced colitis in mice. *Oncotarget* 7.
- Wang, Y., Xu, Y.-M., Zou, Y.-Q., Lin, J., Huang, B., Liu, J., Li, J., Zhang, J., Yang, W.-M., Min, Q.-H., et al. (2017b). Identification of differential expressed PE exosomal miRNA in lung adenocarcinoma, tuberculosis, and other benign lesions. *Medicine* (Baltimore). 96, e8361.
- Wasilewski, A., Zielińska, M., Storr, M., and Fichna, J. (2015). Beneficial effects of probiotics, prebiotics, synbiotics, and psychobiotics in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 1674–1682.
- Watson, R.O., Manzanillo, P.S., and Cox, J.S. (2012). Extracellular M. tuberculosis DNA Targets Bacteria for Autophagy by Activating the Host DNA-Sensing Pathway. *Cell* 150, 803–815.
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schäffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., et al. (2004). NOD2 (CARD15) mutations in Crohn’s disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53, 1658–1664.
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., and Levine, B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol. Cell* 30, 678–688.
- Wei, Y., Zou, Z., Becker, N., Anderson, M., Sumpter, R., Xiao, G., Kinch, L., Koduru, P., Christudass, C.S., Veltri, R.W., et al. (2013). EGFR-Mediated Beclin 1 Phosphorylation in Autophagy Suppression, Tumor Progression, and Tumor Chemoresistance. *Cell* 154, 1269–1284.
- Wei, Y., An, Z., Zou, Z., Sumpter, R., Su, M., Zang, X., Sinha, S., Gaestel, M., and Levine, B. (2015). The stress-responsive kinases MAPKAPK2/MAPKAPK3 activate starvation-induced autophagy through Beclin 1 phosphorylation. *Elife* 4, 1–25.
- Wei, Y., Liu, M., Li, X., Liu, J., and Li, H. (2018). Origin of the Autophagosome Membrane in Mammals. *Biomed Res. Int.* 2018, 1012789.
- Weiser, M., Simon, J.M., Kochar, B., Tovar, A., Israel, J.W., Robinson, A., Gipson, G.R., Schaner, M.S., Herfarth, H.H., Sartor, R.B., et al. (2018). Molecular classification of Crohn’s disease reveals two clinically relevant subtypes. *Gut* 67, 36–42.
- West, N.R., Hegazy, A.N., Owens, B.M.J., Bullers, S.J., Linggi, B., Buonocore, S., Coccia, M., Görtz, D., This, S., Stockenhuber, K., et al. (2017). Oncostatin M drives intestinal inflammation and predicts response to tumor necrosis factor-neutralizing therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Nat. Med.* 23, 579–589.
- Whang, M.I., Tavares, R.M., Benjamin, D.I., Kattah, M.G., Advincula, R., Nomura, D.K., Debnath, J., Malynn, B.A., and Ma, A. (2017). The Ubiquitin Binding Protein TAX1BP1 Mediates Autophagosome Induction and the Metabolic Transition of Activated T Cells. *Immunity* 46, 405–420.
- Wild, C.P. (2005). Complementing the Genome with an “Exposome”: The Outstanding Challenge of Environmental Exposure Measurement in Molecular Epidemiology. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14, 1847–1850.
- Wild, P., Farhan, H., McEwan, D.G., Wagner, S., Rogov, V. V., Brady, N.R., Richter, B., Korac, J., Waidmann, O., Choudhary, C., et al. (2011). Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* (80-.). 333, 228–233.
- Wildenberg, M.E., Vos, A.C.W., Wolfkamp, S.C.S., Duijvestein, M., Verhaar, A.P., Te Velde, A.A., van den Brink, G.R., and Hommes, D.W. (2012). Autophagy attenuates the adaptive immune response by destabilizing the immunologic synapse. *Gastroenterology* 142, 1493–503.e6.
- Wine, E., Ossa, J.C., Gray-Owen, S.D., and Sherman, P.M. (2009). Adherent-invasive Escherichia coli, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia. *BMC Microbiol.* 9, 1–11.
- Wittkopf, N., Günther, C., Martini, E., Waldner, M., Amann, K.U., Neurath, M.F., and Becker, C. (2012). Lack of Intestinal Epithelial Atg7 Affects Paneth Cell Granule Formation but Does Not Compromise Immune Homeostasis in the Gut. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 1–9.
- Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.* 13, 269–288.
- Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Théry, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., et al. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat. Med.* 7, 297–303.
- Wong, C.-H., and Chen, Y.-C. (2019). Clinical significance of exosomes as potential biomarkers in cancer. *World J. Clin. Cases* 7, 171–190.
- Wong, W.-Y., Lee, M.M.-L., Chan, B.D., Kam, R.K.-T., Zhang, G., Lu, A.-P., and Tai, W.C.-S. (2016). Proteomic profiling of dextran sulfate sodium induced acute ulcerative colitis mice serum exosomes and their immunomodulatory impact on macrophages. *Proteomics* 16, 1131–1145.
- Wu, F., Zikusoka, M., Trindade, A., Dassopoulos, T., Harris, M.L., Bayless, T.M., Brant, S.R., Chakravarti, S., and Kwon, J.H. (2008). MicroRNAs Are Differentially Expressed in Ulcerative Colitis and Alter Expression of Macrophage Inflammatory Peptide-2 α . *Gastroenterology* 135, 1624–1635.e24.
- Wu, F., Zhang, S., Dassopoulos, T., Harris, M.L., Bayless, T.M., Meltzer, S.J., Brant, S.R., and Kwon, J.H. (2010). Identification of microRNAs associated with ileal and colonic Crohn’s disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 16, 1729–1738.
- Wu, F., Guo, N.J., Tian, H., Marohn, M., Gearhart, S., Bayless, T.M., Brant, S.R., and Kwon, J.H. (2011). Peripheral

blood MicroRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 241–250.

Wu, H., Wang, F., Hu, S., Yin, C., Li, X., Zhao, S., Wang, J., and Yan, X. (2012). MiR-20a and miR-106b negatively regulate autophagy induced by leucine deprivation via suppression of ULK1 expression in C2C12 myoblasts. *Cell. Signal.* 24, 2179–2186.

Wu, L.Y., Ma, X.P., Shi, Y., Bao, C.H., Jin, X.M., Lu, Y., Zhao, J.M., Zhou, C.L., Chen, D., and Liu, H.R. (2017). Alterations in microRNA expression profiles in inflamed and noninflamed ascending colon mucosae of patients with active Crohn's disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 32, 1706–1715.

Wu, S., Zhang, Y., Lu, R., Xia, Y., Zhou, D., Petrof, E.O., Claud, E.C., Chen, D., Chang, E.B., Carmeliet, G., et al. (2015a). Intestinal epithelial vitamin D receptor deletion leads to defective autophagy in colitis. *Gut* 64, 1082–1094.

Wu, W., He, C., Liu, C., Cao, A.T., Xue, X., Evans-Marin, H.L., Sun, M., Fang, L., Yao, S., Pinchuk, I. V., et al. (2015b). miR-10a inhibits dendritic cell activation and Th1/Th17 cell immune responses in IBD. *Gut* 64, 1755–1764.

Wu, Y., Xu, X., Kang, J., Wang, J., Wen, Y., Yan, Y., Qian, H., Zhang, X., Xu, W., Mao, F., et al. (2018). Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate inflammatory bowel disease in mice through ubiquitination. *Am. J. Transl. Res.* 10, 2026–2036.

Wu, Z., Wang, L., Li, J., Wang, L., Wu, Z., and Sun, X. (2019). Extracellular Vesicle-Mediated Communication Within Host-Parasite Interactions. *Front. Immunol.* 9.

Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T.M., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.-W., Geuze, H.J., and Stoorvogel, W. (2003). Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes. *J. Biol. Chem.* 278, 10963–10972.

X

Xu, X.-M., and Zhang, H.-J. (2016). miRNAs as new molecular insights into inflammatory bowel disease: Crucial regulators in autoimmunity and inflammation. *World J. Gastroenterol.* 22, 2206–2218.

Xu, X., Araki, K., Li, S., Han, J.-H., Ye, L., Tan, W.G., Konieczny, B.T., Bruinsma, M.W., Martinez, J., Pearce, E.L., et al. (2014). Autophagy is essential for effector CD8+ T cell survival and memory formation. *Nat. Immunol.* 15, 1152–1161.

Xue, X., Cao, A.T., Cao, X., Yao, S., Carlsen, E.D., Soong, L., Liu, C.-G., Liu, X., Liu, Z., Duck, L.W., et al. (2014). Downregulation of microRNA-107 in intestinal CD11c + myeloid cells in response to microbiota and proinflammatory cytokines increases IL-23p19 expression. *Eur. J. Immunol.* 44, 673–682.

Y

Yakymenko, O., Schoultz, I., Gullberg, E., Ström, M., Almer, S., Wallon, C., Wang, A., Keita, Å. V., Campbell, B.J., McKay, D.M., et al. (2018). Infliximab restores colonic barrier to adherent-invasive *E. coli* in Crohn's disease via effects on epithelial lipid rafts. *Scand. J. Gastroenterol.* 53, 677–684.

Yamazaki, H., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Tagawa, Y., Okamura, M., Ogata, R., Huang, T., Nakajima, S., Yao, J., Paton, A.W., et al. (2009). Activation of the Akt-NF-κB Pathway by Subtilase Cytotoxin through the ATF6 Branch of the Unfolded Protein Response. *J. Immunol.* 183, 1480–1487.

Yanai, H., Salomon, N., and Lahat, A. (2016). Complementary Therapies in Inflammatory Bowel Diseases. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 18, 62.

Yáñez-Mó, M., Siljander, P.R.-M., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borràs, F.E., Buzas, E.I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., et al. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* 4, 27066.

Yang, C., Chalasani, G., Ng, Y.-H., and Robbins, P.D. (2012). Exosomes Released from Mycoplasma Infected Tumor Cells Activate Inhibitory B Cells. *PLoS One* 7, e36138.

Yang, L., Liu, C., Zhao, W., He, C., Ding, J., Dai, R., Xu, K., Xiao, L., Luo, L., Liu, S., et al. (2018a). Impaired Autophagy in Intestinal Epithelial Cells Alters Gut Microbiota and Host Immune Responses. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, AEM.00880-18.

Yang, S.-K., Hong, M., Zhao, W., Jung, Y., Baek, J., Tayebi, N., Kim, K.M., Ye, B.D., Kim, K.-J., Park, S.H., et al. (2014). Genome-wide association study of Crohn's disease in Koreans revealed three new susceptibility loci and common attributes of genetic susceptibility across ethnic populations. *Gut* 63, 80–87.

Yang, T., Martin, P., Fogarty, B., Brown, A., Schurman, K., Phipps, R., Yin, V.P., Lockman, P., and Bai, S. (2015). Exosome Delivered Anticancer Drugs Across the Blood-Brain Barrier for Brain Cancer Therapy in Danio Rerio. *Pharm. Res.* 32, 2003–2014.

Yang, X., Meng, S., Jiang, H., Chen, T., and Wu, W. (2010). Exosomes derived from interleukin-10-treated dendritic cells can inhibit trinitrobenzene sulfonic acid-induced rat colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* 45, 1168–1177.

Yang, X., Zhong, X., Tanyi, J.L., Shen, J., Xu, C., Gao, P., Zheng, T.M., DeMichele, A., and Zhang, L. (2013a). mir-30d Regulates multiple genes in the autophagy pathway and impairs autophagy process in human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 431, 617–622.

Yang, X., Shi, G., Guo, J., Wang, C., and He, Y. (2018b). Exosome-encapsulated antibiotic against intracellular infections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Nanomedicine Volume* 13, 8095–8104.

Yang, X.J., Si, R.H., Liang, Y.H., Ma, B.Q., Jiang, Z. Bin, Wang, B., and Gao, P. (2016). Mir-30d increases intracellular survival of *Helicobacter pylori* through inhibition of autophagy pathway. *World J. Gastroenterol.* 22, 3978–3991.

Yang, Y., Fiskus, W., Yong, B., Atadja, P., Takahashi, Y., Pandita, T.K., Wang, H.-G., and Bhalla, K.N. (2013b).

Acetylated hsp70 and KAP1-mediated Vps34 SUMOylation is required for autophagosome creation in autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 6841–6846.

Yao, Y., Li, H., Da, X., He, Z., Tang, B., Li, Y., Hu, C., Xu, C., Chen, Q., and Wang, Q.K. (2019). SUMOylation of Vps34 by SUMO1 promotes phenotypic switching of vascular smooth muscle cells by activating autophagy in pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Pharmacol. Ther.* *55*, 38–49.

Yilmaz, B., Juillerat, P., Øyås, O., Ramon, C., Bravo, F.D., Franc, Y., Fournier, N., Michetti, P., Mueller, C., Geuking, M., et al. (2019). Microbial network disturbances in relapsing refractory Crohn's disease. *Nat. Med.* *25*, 323–336.

Yin, Z., Pascual, C., and Klionsky, D. (2016). Autophagy: machinery and regulation. *Microb. Cell* *3*, 588–596.

Ying, W., Riopel, M., Bandyopadhyay, G., Dong, Y., Birmingham, A., Seo, J.B., Ofrecio, J.M., Wollam, J., Hernandez-Carretero, A., Fu, W., et al. (2017). Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate In Vivo and In Vitro Insulin Sensitivity. *Cell* *171*, 372–384.e12.

You, L., Wang, Z., Li, H., Shou, J., Jing, Z., Xie, J., Sui, X., Pan, H., and Han, W. (2015). The role of STAT3 in autophagy. *Autophagy* *11*, 729–739.

Yu, L., McPhee, C.K., Zheng, L., Mardones, G.A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., et al. (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* *465*, 942–946.

Yu, M., Luo, Y., Cong, Z., Mu, Y., Qiu, Y., and Zhong, M. (2018). MicroRNA-590-5p Inhibits Intestinal Inflammation by Targeting YAP. *J. Crohn's Colitis* *12*, 993–1004.

Yu, Z.Q., Ni, T., Hong, B., Wang, H.Y., Jiang, F.J., Zou, S., Chen, Y., Zheng, X.L., Klionsky, D.J., Liang, Y., et al. (2012). Dual roles of Atg8 - PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy* *8*, 883–892.

Yuan, H.-X., Russell, R.C., and Guan, K.-L. (2013). Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy* *9*, 1983–1995.

Yue, W., Liu, Y., Li, X., Lv, L., Huang, J., and Liu, J. (2019). Curcumin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice via regulation of autophagy and intestinal immunity. *Turkish J. Gastroenterol.* *30*, 290–298.

Z

Zacharopoulou, E., Gazouli, M., Tzouvala, M., Vezakis, A., and Karamanolis, G. (2017). The contribution of long non-coding RNAs in Inflammatory Bowel Diseases. *Dig. Liver Dis.* *49*, 1067–1072.

Zahm, A.M., Thayu, M., Hand, N.J., Horner, A., Leonard, M.B., and Friedman, J.R. (2011). Circulating MicroRNA Is a Biomarker of Pediatric Crohn Disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *53*, 26–33.

Zalckvar, E., Berissi, H., Mizrachy, L., Idelchuk, Y., Koren, I., Eisenstein, M., Sabanay, H., Pinkas-Kramarski, R., and Kimchi, A. (2009). DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep.* *10*, 285–292.

Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A.J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.-D. (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* *56*, 61–72.

Zeng, F., and Morelli, A.E. (2018). Extracellular vesicle-mediated MHC cross-dressing in immune homeostasis, transplantation, infectious diseases, and cancer. *Semin. Immunopathol.* *40*, 477–490.

Zhang, Y.-Z., and Li, Y.-Y. (2014). Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* *20*, 91–99.

Zhang, C., Yan, J., Xiao, Y., Shen, Y., Wang, J., Ge, W., and Chen, Y. (2017a). Inhibition of Autophagic Degradation Process Contributes to Claudin-2 Expression Increase and Epithelial Tight Junction Dysfunction in TNF- α Treated Cell Monolayers. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 157.

Zhang, C., Yang, X., Qi, Q., Gao, Y., Wei, Q., and Han, S. (2018a). lncRNA-HEIH in serum and exosomes as a potential biomarker in the HCV-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomarkers* *21*, 651–659.

Zhang, H., Zheng, L., McGovern, D.P.B., Hamill, A.M., Ichikawa, R., Kanazawa, Y., Luu, J., Kumagai, K., Cilluffo, M., Fukata, M., et al. (2017b). Myeloid ATG16L1 Facilitates Host–Bacteria Interactions in Maintaining Intestinal Homeostasis. *J. Immunol.* *198*, 2133–2146.

Zhang, H. jia, Xu, B., Wang, H., Xu, B., Wang, G. dong, Jiang, M. zuo, Lei, C., Ding, M. ling, Yu, P. fei, Nie, Y. zhan, et al. (2018b). IL-17 is a protection effector against the adherent-invasive Escherichia coli in murine colitis. *Mol. Immunol.* *93*, 166–172.

Zhang, J., Wang, P., Wan, L., Xu, S., and Pang, D. (2017c). The emergence of noncoding RNAs as Heracles in autophagy. *Autophagy* *13*, 1004–1024.

Zhang, M., Viennois, E., Prasad, M., Zhang, Y., Wang, L., Zhang, Z., Han, M.K., Xiao, B., Xu, C., Srinivasan, S., et al. (2016). Edible ginger-derived nanoparticles: A novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer. *Biomaterials* *101*, 321–340.

Zhang, Q., Pan, Y., Yan, R., Zeng, B., Wang, H., Zhang, X., Li, W., Wei, H., and Liu, Z. (2015a). Commensal bacteria direct selective cargo sorting to promote symbiosis. *Nat. Immunol.* *1–12*.

Zhang, W., Jiang, X., Bao, J., Wang, Y., Liu, H., and Tang, L. (2018c). Exosomes in Pathogen Infections: A Bridge to Deliver Molecules and Link Functions. *Front. Immunol.* *9*, 1–12.

Zhang, X., Shi, H., Lin, S., Ba, M., and Cui, S. (2015b). MicroRNA-216a enhances the radiosensitivity of pancreatic cancer cells by inhibiting beclin-1-mediated autophagy. *Oncol. Rep.* *34*, 1557–1564.

Zhang, X., Deeke, S.A., Ning, Z., Starr, A.E., Butcher, J., Li, J., Mayne, J., Cheng, K., Liao, B., Li, L., et al. (2018d). Metaproteomics reveals associations between microbiome and intestinal extracellular vesicle proteins in pediatric inflammatory bowel disease. *Nat. Commun.* *9*, 2873.

Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., and Tang, W.H. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential.

Cell Biosci. 9, 19.

Zhao, Y.G., and Zhang, H. (2019). Autophagosome maturation: An epic journey from the ER to lysosomes. *J. Cell Biol.* 218, 757–770.

Zhao, H., Shang, Q., Pan, Z., Bai, Y., Li, Z., Zhang, H., Zhang, Q., Guo, C., Zhang, L., and Wang, Q. (2018). Exosomes From Adipose-Derived Stem Cells Attenuate Adipose Inflammation and Obesity Through Polarizing M2 Macrophages and Beiging in White Adipose Tissue. *Diabetes* 67, 235–247.

Zhao, J., Brault, J.J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S.H., and Goldberg, A.L. (2007). FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atroaching Muscle Cells. *Cell Metab.* 6, 472–483.

Zhao, J., Sun, Y., Shi, P., Dong, J.-N., Zuo, L.-G., Wang, H.-G., Gong, J.-F., Li, Y., Gu, L.-L., Li, N., et al. (2015). Celastrol ameliorates experimental colitis in IL-10 deficient mice via the up-regulation of autophagy. *Int. Immunopharmacol.* 26, 221–228.

Zhao, Y., Haney, M.J., Gupta, R., Bohnsack, J.P., He, Z., Kabanov, A. V., and Batrakova, E. V. (2014). GDNF-Transfected Macrophages Produce Potent Neuroprotective Effects in Parkinson’s Disease Mouse Model. *PLoS One* 9, e106867.

Zheng, X., Chen, F., Zhang, Q., Liu, Y., You, P., Sun, S., Lin, J., and Chen, N. (2017). Salivary exosomal PSMA7: a promising biomarker of inflammatory bowel disease. *Protein Cell* 8, 686–695.

Zheng, Y.T., Shahnazari, S., Brech, A., Lamark, T., Johansen, T., and Brumell, J.H. (2009). The Adaptor Protein p62/SQSTM1 Targets Invading Bacteria to the Autophagy Pathway. *J. Immunol.* 183, 5909–5916.

Zhong, Z., Umemura, A., Sanchez-Lopez, E., Liang, S., Shalpour, S., Wong, J., He, F., Boassa, D., Perkins, G., Ali, S.R., et al. (2016). NF- κ B Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria. *Cell* 164, 896–910.

Zhou, F., Hamza, T., Fleur, A.S., Zhang, Y., Yu, H., Chen, K., Heath, J.E., Chen, Y., Huang, H., and Feng, H. (2018). Mice with inflammatory bowel disease are susceptible to clostridium difficile infection with severe disease outcomes. *Inflamm. Bowel Dis.* 24, 573–582.

Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221–225.

Zhu, J., and Mohan, C. (2010). Toll-Like Receptor Signaling Pathways—Therapeutic Opportunities. *Mediators Inflamm.* 2010, 1–7.

Zhu, H., Wu, H., Liu, X., Li, B., Chen, Y., Ren, X., Liu, C.-G., and Yang, J.-M. (2009). Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. *Autophagy* 5, 816–823.

Zippi, M. (2006). Mesenteric adenitis caused by *Yersinia pseudotuberculosis* in a patient subsequently diagnosed with Crohn’s disease of the terminal ileum. *World J. Gastroenterol.* 12, 3933.

Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: Dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med.* 4, 594–600.

de Zoeten, E.F., Wang, L., Sai, H., Dillmann, W.H., and Hancock, W.W. (2010). Inhibition of HDAC9 Increases T Regulatory Cell Function and Prevents Colitis in Mice. *Gastroenterology* 138, 583–594.

Zwiers, A., Kraal, L., van de Pouw Kraan, T.C.T.M., Wurdinger, T., Bouma, G., and Kraal, G. (2012). Cutting Edge: A Variant of the IL-23R Gene Associated with Inflammatory Bowel Disease Induces Loss of MicroRNA Regulation and Enhanced Protein Production. *J. Immunol.* 188, 1573–1577.

QUATRIÈME PARTIE

– Annexes –

➤ **Valorisation scientifique**

➤ **Revue publiée**

Anaïs Larabi, Nicolas Barnich, Hang Thi Thu Nguyen. “New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD”. *Autophagy*. 2019.

Valorisation Scientifique

PRIX SCIENTIFIQUES

2019

- 2^{ème} Prix de la Communication orale, Journées de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement, 2019.

2017

- Prix “Top Abstract Prize” - 10 000 euros, remis lors du congrès international UEGW (United European Gastroenterology Week) à Barcelone, Espagne.
- Bourse “Travel grant” – 1000 euros, pour assister au congrès international UEGW (United European Gastroenterology Week) à Barcelone, Espagne.
- Prix “National Scholar Award” – France, remis lors du congrès international UEGW (United European Gastroenterology Week) à Barcelone, Espagne.
- Bourse couvrant les frais d'inscription au congrès – 200 euros. Congrès CFATG (Club Francophone de l'Autophagie) à Paris, France.

2016

- Bourse “Travel grant” – 1000 euros, pour assister au congrès international UEGW (United European Gastroenterology Week) à Vienne, Autriche.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications

1. Anaïs Larabi, Nicolas Barnich, Hang Thi Thu Nguyen. “New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD”. *Autophagy*. 2019.
2. Alexis Bretin, Cécily Lucas, Anaïs Larabi, Guillaume Dalmaso, Elisabeth Billard, Nicolas Barnich, Richard Bonnet, Hang Thi Thu Nguyen. “AIEC infection triggers modification of gut microbiota composition in genetically predisposed mice, contributing to intestinal inflammation”. *Scientific reports*. 2017.

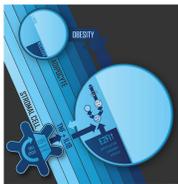
Manuscrits en soumission

1. Anaïs Larabi, Guillaume Dalmaso, Julien Delmas, Nicolas Barnich, Hang Thi Thu Nguyen. “Exosomes transfer miRNAs from cell-to-cell to inhibit autophagy during infection with Crohn’s disease-associated adherent-invasive *E. coli*”. En soumission dans le journal *Gut Microbes*.

2. Anaïs Larabi, Guillaume Dalmasso, Lucie Etienne-Mesmin, Charlotte Cordonnier, Nicolas Barnich, Hang Thi Thu Nguyen. “Differential miRNA-gene expression in intestinal epithelial cells and M cells in response to Crohn disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*”. En soumission dans le journal World Journal of Gastroenterology.
3. Cécily Lucas, Laurène Salesse, Guillaume Dalmasso, Mathilde Bonnet, Pierre Sauvanet, Anaïs Larabi, Denis Pezet, Philip Rosenstiel, Nicolas Barnich, Richard Bonnet, Hang Thi Thu Nguyen. “Autophagy suppresses protumoral effects of colibactin genotoxin-producing *Escherichia coli* , inhibiting colorectal carcinogenesis”. En soumission dans le journal Gastroenterology.

Présentations à des congrès nationaux et internationaux

1. Exosomes released from intestinal epithelial cells infected with Crohn’s disease-associated adherent-invasive *E. coli* transfer miRNAs into recipient cells to inhibit autophagy – Keystone Symposia, Montréal, 2018. Poster.
2. Upon AIEC infection, Crohn’s disease-associated circulating microRNAs are transferred between human macrophages *via* the exosomal shuttle – UEGW, Vienne, 2019. Poster.
3. Exosomes released from intestinal epithelial cells infected with Crohn’s disease-associated adherent-invasive *E. coli* transfer miRNAs into recipient cells to inhibit autophagy – CFATG, Paris, 2017. Communication orale.
4. Exosomes released from intestinal epithelial cells infected with crohn’s disease-associated adherent-invasive *E. coli* transfer mirnas into recipient cells to inhibit autophagy – UEGW, Barcelone , 2017. Communication orale.
5. Exosomes released from intestinal epithelial cells infected with Crohn’s disease-associated adherent-invasive *E. coli* transfer miRNAs into recipient cells to inhibit autophagy – EMBO, Cavtat-Dubrovnik, 2017. Communication orale.
6. Crohn’s disease-associated circulating microRNAs are secreted in exosomes from AIEC-infected human macrophages and involved in regulation of host innate immune responses in recipient cells – UEGW, Vienne, 2016. Communication orale.



New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD

Anaïs Larabi, Nicolas Barnich & Hang Thi Thu Nguyen

To cite this article: Anaïs Larabi, Nicolas Barnich & Hang Thi Thu Nguyen (2019): New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD, *Autophagy*, DOI: [10.1080/15548627.2019.1635384](https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1635384)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1635384>



© 2019 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



Published online: 09 Jul 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 495



View Crossmark data [↗](#)

New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD

Anaïs Larabi, Nicolas Barnich, and Hang Thi Thu Nguyen

M2iSH, UMR 1071 Inserm, INRA USC 2018, CRNH, University of Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France

ABSTRACT

One of the most significant challenges of inflammatory bowel disease (IBD) research is to understand how alterations in the symbiotic relationship between the genetic composition of the host and the intestinal microbiota, under impact of specific environmental factors, lead to chronic intestinal inflammation. Genome-wide association studies, followed by functional studies, have identified a role for numerous autophagy genes in IBD, especially in Crohn disease. Studies using *in vitro* and *in vivo* models, in addition to human clinical studies have revealed that autophagy is pivotal for intestinal homeostasis maintenance, gut ecology regulation, appropriate intestinal immune responses and anti-microbial protection. This review describes the latest researches on the mechanisms by which dysfunctional autophagy leads to disrupted intestinal epithelial function, gut dysbiosis, defect in anti-microbial peptide secretion by Paneth cells, endoplasmic reticulum stress response and aberrant immune responses to pathogenic bacteria. A better understanding of the role of autophagy in IBD pathogenesis may provide better sub-classification of IBD phenotypes and novel approaches for disease management.

Abbreviations: AIEC: adherent-invasive *Escherichia coli*; AMPK: AMP-activated protein kinase; ATF6: activating transcription factor 6; ATG: autophagy related; *Atg1611[ΔIEC]* mice: mice with *Atg1611* depletion specifically in intestinal epithelial cells; *Atg1611[HM]* mice: mice hypomorphic for *Atg1611* expression; BCL2: B cell leukemia/lymphoma 2; BECN1: beclin 1, autophagy related; CALCOCO2: calcium binding and coiled-coil domain 2; CASP: caspase; CD: Crohn disease; CGAS: cyclic GMP-AMP synthase; CHUK/IKKA: conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase; CLDN2: claudin 2; DAPK1: death associated protein kinase 1; DCs: dendritic cells; DSS: dextran sulfate sodium; EIF2A: eukaryotic translation initiation factor 2A; EIF2AK: eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase; ER: endoplasmic reticulum; ERBIN: Erbb2 interacting protein; ERN1/IRE1A: ER to nucleus signaling 1; FBNP1L: formin binding protein 1-like; FOXP3: forkhead box P3; GPR65: G-protein coupled receptor 65; GSK3B: glycogen synthase kinase 3 beta; IBD: inflammatory bowel disease; IECs: intestinal epithelial cells; IFN: interferon; IL: interleukin; IL10R: interleukin 10 receptor; IRGM: immunity related GTPase M; ISC: intestinal stem cell; LAMP1: lysosomal-associated membrane protein 1; LAP: LC3-associated phagocytosis; MAP1LC3B: microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta; LPS: lipopolysaccharide; LRRK2: leucine-rich repeat kinase 2; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MHC: major histocompatibility complex; MIF: macrophage migration inhibitory factor; MIR/miRNA: microRNA; MTMR3: myotubularin related protein 3; MTOR: mechanistic target of rapamycin kinase; MYD88: myeloid differentiation primary response gene 88; NLRP3: NLR family, pyrin domain containing 3; NOD2: nucleotide-binding oligomerization domain containing 2; NPC: Niemann-Pick disease type C; NPC1: NPC intracellular cholesterol transporter 1; OMVs: outer membrane vesicles; OPTN: optineurin; PI3K: phosphoinositide 3-kinase; PRR: pattern-recognition receptor; PTPN2: protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2; PTPN22: protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid); PYCARD/ASC: PYD and CARD domain containing; RAB2A: RAB2A, member RAS oncogene family; RELA: v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian); RIPK2: receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2; ROS: reactive oxygen species; SNPs: single nucleotide polymorphisms; SQSTM1: sequestosome 1; TAX1BP1: Tax1 binding protein 1; Th: T helper 1; TIRAP/TRIF: toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein; TLR: toll-like receptor; TMEM173/STING: transmembrane protein 173; TMEM59: transmembrane protein 59; TNF/TNFA: tumor necrosis factor; Treg: regulatory T; TREM1: triggering receptor expressed on myeloid cells 1; UC: ulcerative colitis; ULK1: unc-51 like autophagy activating kinase 1; WT: wild-type; XBP1: X-box binding protein 1; XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis.

ARTICLE HISTORY

Received 30 January 2019
Revised 11 June 2019
Accepted 19 June 2019

KEYWORDS

Autophagy; immune responses; inflammatory bowel diseases; intestinal homeostasis; intestinal microbiota; microbial infection

Introduction

The etiology of inflammatory bowel diseases (IBD), including Crohn disease (CD) and ulcerative colitis (UC), has involved environmental factors, infectious agents and genetic susceptibility, leading to abnormal mucosal immune response against the

intestinal microbiota [1]. Of the genetic factors implicated in IBD etiology, variants in the autophagy-related genes have been identified. Autophagy is a process conserved during evolution in eukaryotes, by which the cytoplasmic materials are degraded inside the lysosome [2]. Three distinct forms of autophagy have been described, including microautophagy, chaperone-

mediated autophagy and macroautophagy [3]. Macroautophagy is the most studied form, and here we use the term autophagy to refer to macroautophagy if not otherwise mentioned. Autophagy was initially characterized as a nonspecific process induced under starvation conditions to recycle building blocks to compensate for the lack of nutrients, and thus was so-called non-selective bulk autophagy. Later, it has been evidenced that autophagy can be induced in non-starved cells to degrade specific substrates, such as aggregated proteins, damaged mitochondria or invading pathogens, which is known as selective autophagy [4]. Autophagy plays a key role in maintaining intestinal homeostasis, in regulating the interaction between gut microbiota and innate and adaptive immunity, and in host defense against intestinal pathogens [3]. A dysfunction of autophagy is associated with several human pathologies including IBD [2].

The pioneer evidence for the implication of autophagy in IBD etiology came from genome-wide association studies, which revealed single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the autophagy-associated genes as susceptibility factors for CD. Most evidence for the association between these genetic variants and IBD etiology has come from functional studies using the *ATG16L1* (autophagy related 16 like 1)^{T300A} variant [2,5]. Pioneer studies showed that human cells having the *ATG16L1*^{T300A} variant exhibit impaired autophagy-mediated clearance of intracellular bacteria and increased pro-inflammatory cytokine production [5]. Paneth cells from CD patients homozygous for the *ATG16L1*^{T300A} allele, or from mice hypomorphic for *Atg16l1* expression (*Atg16l1*[*HM*] mice), mice with *Atg16l1* depletion specifically in intestinal epithelial cells (*Atg16l1*[*ΔIEC*] mice) or knock-in mice expressing the *ATG16L1*^{T300A} variant exhibit structural and functional aberrances with decreased expression of antimicrobial peptides [2,5]. The *ATG16L1*^{T300A} variant also leads to defects in autophagy induction, bacterial trafficking and antigen processing and presentation in dendritic cells (DCs) [2,5]. Together, these studies suggest a role for *ATG16L1* in the control of intestinal epithelial homeostasis and inflammatory immune responses. The potential mechanisms linking the *ATG16L1*^{T300A} variant to defective autophagy were recently discovered. Indeed, *ATG16L1*^{T300A} protein exhibits enhanced CASP3 (caspase 3)-dependent degradation in response to stress signals [6]. The *ATG16L1*^{T300A} variant also influences the ability of *ATG16L1* to interact with TMEM59 (transmembrane protein 59), which engages *ATG16L1* to induce autophagy in response to bacterial infection [7]. The interaction between *ATG16L1* and NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2), encoded by the first CD susceptibility gene, reinforces the importance of autophagy in CD pathogenesis. Indeed, the CD-associated *NOD2*^{L1007fsinsC} frameshift mutation leads to impaired autophagy-mediated intracellular bacterial clearance, due to a defect in recruiting *ATG16L1* to the plasma membrane at the bacterial entry site, and fails to promote major histocompatibility complex (MHC) II-mediated antigen presentation by DCs [2,5]. Further studies have shown a link between the CD-associated susceptibility gene *IRGM* (immunity related GTPase M) and defect in autophagy-mediated clearance of CD-associated adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC), as well as the association between granulomas, one of the microscopic hallmarks of CD, and the genetic variants in the autophagy-associated genes *ATG4A*, *ATG2A*, *FBNP1L* (formin binding protein 1 like) and *ATG4D* [2,5]. However, the pathological relevance

of the CD-associated SNPs in other autophagy-associated genes, such as *ULK1* (unc-51 like autophagy activating kinase 1), *LRRK2* (leucine rich repeat kinase 2), *PTPN2* (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2) and *CALCOCO2* (calcium binding and coiled-coil domain 2), has remained mostly unknown [2,5].

Efforts have been continuously made to explore the molecular mechanisms by which any shortcoming in autophagy could lead to disrupted intestinal epithelial function, gut dysbiosis, defect in antimicrobial peptide secretion by Paneth cells, endoplasmic reticulum (ER) stress response in enterocytes and aberrant immune responses to pathogenic bacteria, which are hallmarks of IBD pathogenesis. The latest important findings will be discussed in this review.

Autophagy and intestinal homeostasis

Autophagy and intestinal epithelial barrier function

The intestinal epithelium, which separates the luminal content from the mucosal immune system, is an important defensive line to protect the homeostasis of the gut microbiota and minimize intestinal inflammatory responses [8]. Increased intestinal permeability has been reported in IBD, which is associated with abnormal expression of tight junction proteins [9]. In 2015, autophagy was reported for the first time to regulate intestinal barrier function *via* inducing lysosomal degradation of the tight junction protein CLDN2 (claudin 2), thus decreasing epithelial permeability [10]. Increased CLDN2 level and tight junction defects in intestinal epithelial Caco-2 monolayers treated with the pro-inflammatory cytokine TNF/TNFA (tumor necrosis factor) partly arises from the inhibition of autophagy-mediated CLDN2 degradation [11] (Figure 1A). It was recently shown that defects in mitochondria and ER functions induce intestinal permeability, promoting *E. coli* internalization and transcytosis across the epithelium, and these are counteracted by selective autophagy-mediated elimination of intracellular bacteria, which is so-called xenophagy [12]. Moreover, the trans-epithelial permeability instigated by mitochondrial dysfunction is amplified by *NOD2* knock-down in intestinal epithelial T84 cells [13]. These studies together showed a role for autophagy in protection of epithelial barrier function.

Autophagy and epithelial cell death

Epithelial apoptosis, especially TNF-induced apoptosis, has been associated with IBD pathogenesis [14]. Recently, it has been evidenced that autophagy can modulate cytokine-induced programmed cell death in intestinal epithelium, limiting intestinal inflammation [15,16]. Using *Atg16l1*^{ΔIEC} mice exhibiting chronic colitis triggered by the intestinal opportunistic pathogen *Helicobacter hepaticus*, autophagy was demonstrated to protect IECs from TNF-induced apoptosis, allowing the maintenance of intestinal barrier integrity [16]. *Atg16l1*^{ΔIEC} mice infected with murine norovirus and then treated with dextran sulfate sodium (DSS) exhibit exacerbated pathological score and increased non-apoptotic epithelial cell death compared to control mice [15]. Moreover, the viability in response to TNF treatment of intestinal organoids carrying the CD-associated *ATG16L1*^{T300A} variant is

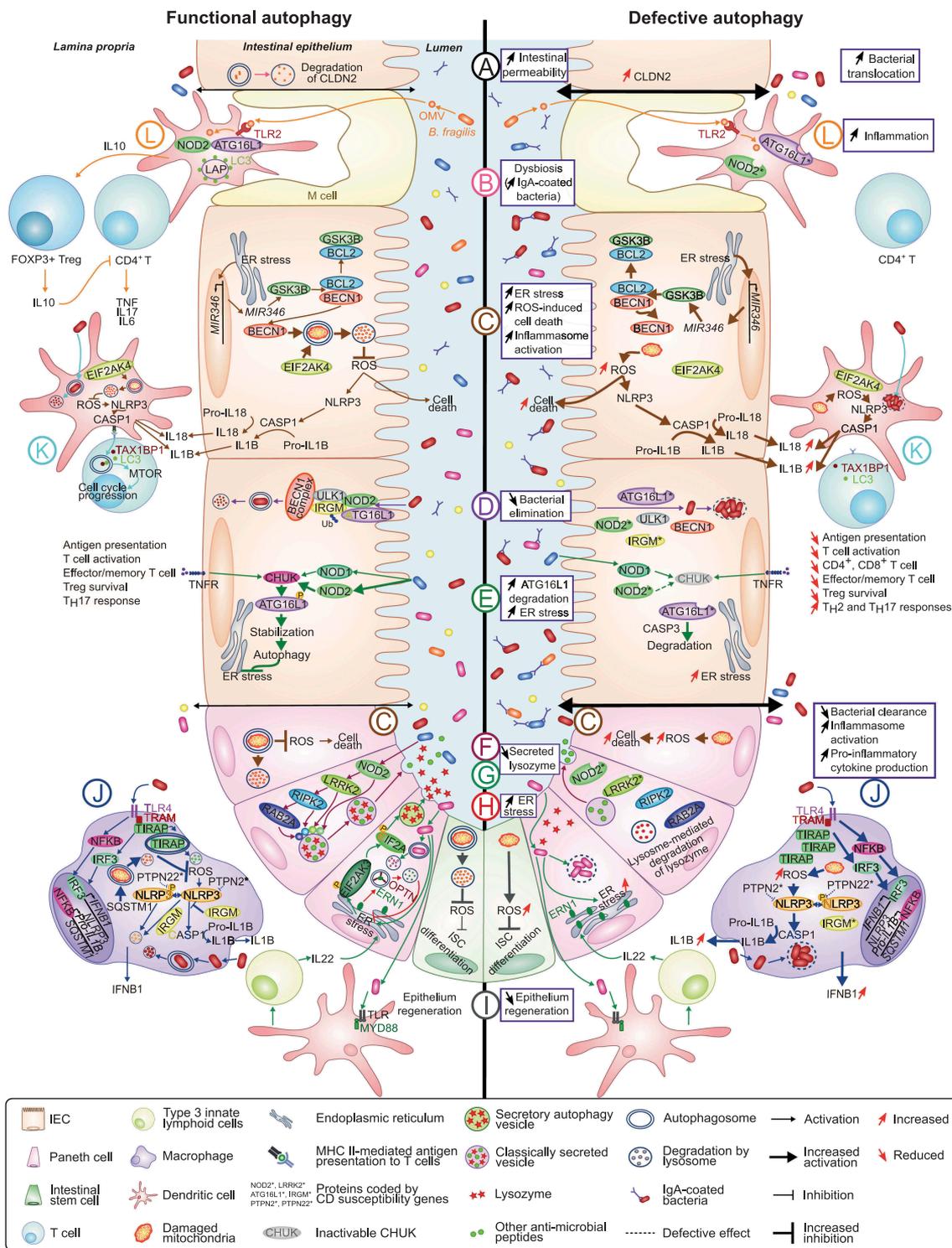


Figure 1. Role of autophagy in the maintenance of intestinal homeostasis and potential mechanisms by which defective autophagy may contribute to CD development. At the intestinal epithelium: (A) Autophagy modulates epithelial barrier function via lysosome-mediated degradation of CLDN2. Dysfunctional autophagy leads to increased CLDN2 level associated with increased intestinal permeability [10,11]. (B) Defective autophagy leads to increased dysbiosis and increased IgA-coated bacterial amount [26,27,32]. (C) By promoting mitochondrial homeostasis, autophagy protects IECs from cell death and prevents loss of Paneth cells [15,16]. *MIR346*, induced under ER stress, enhances *GSK3B* translation, favoring the dissociation between *BCL2* and *BECN1*. This consequently activates mitophagy, thus reducing ROS level [41]. ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation, which leads to *CASP1* activation and subsequently *IL18* and *IL1B* production, is also inhibited by *EIF2AK4*-induced mitophagy upon amino acid starvation [63]. Dysfunctional autophagy leads to accumulation of damaged mitochondria and ROS, increasing inflammasome activation and inflammation [63] and aggravating ROS-induced cell death [41]. (D) *NOD2* recruits *ATG16L1* to the plasma membrane at the bacterial entry site, initiating autophagy. Association of *IRGM* with *NOD2* promotes *IRGM* ubiquitination and the assembly of the core autophagy machinery, promoting xenophagy [76]. Autophagy-associated risk variants induce defective autophagy and impaired intracellular bacterial clearance. (E) Stimulation of *CHUK* and *TNF* receptors in IECs activates *CHUK*, which phosphorylates *ATG16L1*, leading to its stabilization, thus preventing ER stress during inflammation. Inactivation of *CHUK* fails to stabilize *ATG16L1*, which is consequently degraded by *CASP3*, increasing ER stress [47]. (F) In Paneth cells, *NOD2* activation in response to commensal bacteria leads to recruitment of *LRRK2*, *RIPK2* and *RAB2A* to dense core vesicles, a process required for sorting and secretion of lysozyme and other antimicrobial peptides. Dysfunctional *NOD2* or *LRRK2* result in lysosome-mediated degradation of lysozyme [21,22]. (G) During infection of Paneth cells with invasive bacteria, ER-Golgi secretion pathway is impaired, lysozyme is secreted via secretory autophagy. This process requires ER stress-

decreased compared to those carrying the wild-type (WT) *ATG16L1* allele [15]. It has been reported that anti-TNF antibodies, a major biological therapy for IBD, can induce regulatory macrophages resembling to M2 type macrophages implicated in limiting inflammation [17]. It was recently reported that anti-TNF-induced macrophages present an increased level of autophagy compared to IFNG (interferon gamma)-induced macrophages, and that the induction of macrophages by anti-TNF is impaired in healthy subjects carrying the *ATG16L1*^{T300A} variant compared with those having the WT *ATG16L1* allele [17]. Moreover, M2 phenotype and viability of anti-TNF-induced macrophages are dependent on the autophagy-related protein CTSS (cathepsin S) [17]. These results suggested that a functional autophagy is required for an optimal response to anti-TNF therapy in IBD.

A link between autophagy and ERBIN (Erbb2 interacting protein), a protein required for the polarity of epithelial cells and implicated in intestinal inflammation, was recently discovered [18]. ERBIN expression is decreased in the colons of UC patients, or of mice with DSS-induced colitis or mice deficient in *Il10* (interleukin 10), and *Erbin* deficiency in mice leads to increased susceptibility to DSS-induced colitis due to excessive activation of autophagy leading to autophagy cell death [18]. Intraperitoneal injection of chloroquine, an autophagy inhibitor, attenuates excessive inflammatory response in DSS-treated *erbin*^{-/-} mice [18]. Using *in vitro* and *in vivo* models of neonatal necrotizing enterocolitis, an inflammatory intestinal disease of new-born infants, it was reported that TNF induces autophagy *via* the MAPK1/ERK2 (mitogen-activated protein kinase 1)-MAPK3/ERK1 pathway to suppress cell proliferation and promote apoptosis, which might consequently favor disease development [19]. Even if these studies diverged in the precise mechanism of cell death, they all suggested that defective autophagy may lead to an excessive level of epithelial cell death, favoring IBD development.

Autophagy and paneth cell homeostasis and function

Autophagy is critical for the development, maintenance and functions of Paneth cells. Under physiological conditions, antimicrobial peptides are synthesized in the ER and transported to the Golgi, where they are packed into immature secretory dense core vesicles in Paneth cells [20]. Then, immature dense core vesicles undergo a maturation process, during

which the peptides that are destined to extracellular secretion are retained into dense core vesicles, while the others are directed to the endosomal-lysosomal pathway to be degraded. Recent studies have highlighted the mechanism by which lysozyme is sorted into dense core vesicles in Paneth cells, which requires the small GTPase RAB2A (RAB2A, member RAS oncogene family), NOD2, LRRK2 and the adaptor protein RIPK2 (receptor [TNFRSF]-interacting serine-threonine kinase 2) encoded by CD susceptibility genes [21,22]. Mechanistically, NOD2 is activated by symbiotic bacteria-derived muramyl dipeptide, which in turn activates the LRRK2-RIPK2-RAB2A pathway. This allows the recruitment of NOD2, LRRK2, RIPK2 and RAB2A to dense core vesicles, which is required for lysozyme sorting [21,22] (Figure 1F). Dysfunctional NOD2 or LRRK2 results in lysosomal degradation of lysozyme [21,22]. The role of autophagy in maintaining Paneth cell-mediated lysozyme secretion during invasive pathogen infection, which induces ER stress and damages in Golgi apparatus, was recently discovered [23]. Indeed, to counteract Golgi apparatus damages induced by *Salmonella* Typhimurium infection, Paneth cells can bypass the ER-Golgi secretion pathway and redirect lysozyme through an autophagy-based alternative secretion pathway [23] (Figure 1G). Activation of secretory autophagy in Paneth cells requires bacteria-induced ER stress through the EIF2AK3 (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3)-EIF2A (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha) pathway [23]. In addition, it requires activation of MYD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) in DCs and IL22 secretion by type 3 innate lymphoid cells [23]. Importantly, knock-in mice expressing the *ATG16L1*^{T300A} variant exhibit disruption of both ER-Golgi secretion pathway and secretory autophagy in Paneth cells in response to invasive bacterial infection [23] (Figure 1G). These results supported a role for autophagy in lysozyme secretion during bacterial infection, and suggested how the CD-associated variants in autophagy genes could lead to aberrant lysozyme packaging and secretion that characterize dysfunctional Paneth cells in CD patients. Furthermore, using *Atg16l1* [Δ IEC] mice and a virally-triggered mouse model of IBD, it was reported that by promoting mitochondrial homeostasis, autophagy is essential to prevent Paneth cell loss and exaggerated cell death, thus contributing to intestinal barrier maintenance [15] (Figure 1C).

mediated EIF2AK3-EIF2A activation in Paneth cells and activation of TLR-MYD88 in DCs that promotes IL22 secretion by type 3 innate lymphoid cells. Paneth cells with defective autophagy fails to secrete lysozyme *via* secretory autophagy [23]. (H) During ER stress in Paneth cells, ERN1 is recruited to autophagosomes *via* its interaction with OPTN, thus being degraded by autophagy. Impaired clearance of ERN1 aggregates during ER stress due to defective autophagy leads to increased ER stress and spontaneous CD-like transmural ileitis in mice [44]. (I) In intestinal stem cells, autophagy limits ROS accumulation that inhibits their differentiation, allowing epithelium regeneration. Defective autophagy leads to ROS accumulation and impaired epithelium regeneration [57]. (J) In macrophages, in response to TLR4 activation, which drives TIRAP-dependent inflammation, autophagy is activated to control TIRAP turnover and to limit production of IFN β 1. Defective autophagy leads to TIRAP accumulation and subsequently increased IFN β 1 production [83]. In response to TLR4 activation, NF κ B activates expression of NLRP3, pro-IL1 β and SQSTM1 [67]. SQSTM1 promotes mitophagy to prevent NLRP3 inflammasome activation, thus inhibiting IL1 β production [67]. IRGM also limits NLRP3 inflammasome activation by preventing its assembly and by mediating selective autophagic degradation of the inflammasome components [68]. Defective autophagy leads to accumulation of dysfunctional mitochondria and ROS, enhancing NLRP3 inflammasome activation and subsequently IL1 β production. (K) In DCs, autophagy degrades intracellular pathogens and participates in the presentation of antigens to T cells to induce adaptive immune responses. EIF2AK4-induced mitophagy inhibits ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation, decreasing IL18 and IL1 β production [63]. Defective autophagy leads to impaired bacterial elimination and antigen presentation, impairing T cell activation [92]. T cell activation is supported by the autophagic receptor TAX1BP1 that binds to LC3 and induces autophagy, providing critical amino acids that activates mTORC1 complex and induces metabolic transition of activated T cells [99]. An alteration of autophagy impairs T cell metabolic transition and proliferation, leading to decreased numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, impaired memory CD8⁺ T cell development, decreased Treg cell survival and increased Th2 and Th17 responses [91,93–99]. (L) *Bacteroides fragilis* from gut microbiota secrete immunomodulatory molecules through OMVs that are recognized by DCs *via* TLR2, activating LAP through NOD2 and ATG16L1 and inducing FOXP3⁺ Treg cells, which produce IL10, thus limiting CD4⁺ T cell-mediated inflammatory responses [101,102]. DCs having the autophagy-related risk variants fail to induce IL10 production by FOXP3⁺ Treg cells in response to *B. fragilis*-derived OMVs [101,102].

The autophagy-associated protein IRGM and its murine ortholog IRGM1 have also a role in Paneth cell morphology and function. Indeed, *irgm1*^{-/-} mice display marked Paneth cell alterations, including abnormal secretory granule development, decreased expression of selected antimicrobial peptides and increased susceptibility to DSS-induced colitis [24]. Moreover, in contrast to conventionally raised *irgm1*^{-/-} mice, specific-pathogen-free *irgm1*^{-/-} mice present only a slight increase in susceptibility to DSS-induced inflammation and minimal abnormalities in Paneth cell morphology and antimicrobial peptide production [25]. These mice also present a profound difference in the gut microbiota composition [25]. These suggest that environmental conditions, by modifying the gut microbiota composition, strongly impact the effect of genetic susceptibility on Paneth cells, and subsequently on epithelial functions and susceptibility to intestinal inflammation.

Together, these studies show that autophagy is a key regulator of Paneth cell homeostasis, and that autophagy dysfunction might be implicated in the abnormality of Paneth cells observed in CD.

Autophagy and gut microbiota

Autophagy has a role in the control of gut microbiota composition, and dysfunctional autophagy has been linked with intestinal dysbiosis (Figure 1B). Indeed, mice with colonic epithelial cell-specific *Atg7* deficiency show altered fecal microbiota composition with an increase in total bacteria and an enrichment in *Clostridium leptum*, *Eubacterium cylindroides* and *Bacteroides fragilis* compared to WT control mice [26]. Furthermore, mice with colonic epithelial cell-specific *Atg7* deficiency exhibit increased bacterial burden in the colonic epithelium compared with WT mice under the steady state and following DSS-induced colitis [26]. Similarly, compared with WT mice, *Atg5*[Δ IEC] mice exhibit altered gut microbiota composition with reduced diversity, as observed in CD, and a decreased number of the bacteria implicated in the control of inflammatory responses, such as those from the *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* families, of which the abundance is decreased in CD [27]. Conversely, *Atg5*[Δ IEC] mice exhibit an increased number of pro-inflammatory bacteria, such as those from the *Pasteurellaceae* family, of which the abundance is increased in CD [27]. Moreover, *Atg5*[Δ IEC] mice exhibit decreased abundance of *Akkermansia muciniphila*, as shown in IBD, and increased abundance of *Candidatus Athromitus*, segmented filamentous bacteria able to induce the differentiation of naïve CD4⁺ T cells towards Th (T helper) 1 and Th17 cells implicated in IBD pathogenesis [27]. Recently, changes in the fecal microbiota composition of knock-in mice expressing the *ATG16L1*^{T300A} variant compared to WT mice at steady state with an increase in the order Bacteroidales was reported [28]. During DSS-induced colitis, the knock-in mice display altered fecal microbial composition associated with a decrease in the phylum *Firmicutes* and an increase in the phyla *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* and *Cyanobacteria*, compared to WT mice [28]. Gnotobiotically-housed knock-in mice expressing the *ATG16L1*^{T300A} variant that received stool from a patient with active CD, but not from one with active UC, exhibit a difference in the fecal

microbiota composition, with an increase in *Bacteroides* abundance, compared to WT mice [28]. This is associated with increased Th17 and Th1 cells in the lamina propria of the colon and the ileum without the development of intestinal inflammation [28]. Together, these results revealed that the *ATG16L1*^{T300A} risk variant contributes to gut dysbiosis and dysregulated immune response prior to disease symptoms. However, how host genotype or particular SNPs influence gut microbiota composition or function is still not fully understood. Or in other words, cause-consequence mechanisms behind the link between human host genetics and the gut microbiota are still unclear.

Recently, our group showed that deficiency of the amino acid deprivation sensor EIF2AK4 (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4) in mice, which leads to impaired autophagy-mediated clearance of CD-associated AIEC and consequently enhanced inflammation [29], induces changes in the fecal microbiota composition upon AIEC colonization but not under the steady state [30]. This suggested that in some conditions, defective autophagy alone does not trigger intestinal dysbiosis but its combination with an infectious agent can do so. It was reported that the IBD-associated risk variants, including those in *NOD2*, *ATG16L1* and *IRGM* genes, can influence the fecal microbiota composition of healthy individuals, characterized by a decrease in *Roseburia spp.*, an acetate-to-butyrate converter that produces butyrate, a short-chain fatty acid having an important role in IEC homeostasis [31]. Zhang and co-authors also reported an increased amount of IgA-coated bacteria, which were identified as IBD-promoting microbes [32], in the feces of mice with myeloid cell-specific *Atg16l1* deficiency and in both non-IBD and CD patients carrying the *ATG16L1*^{T300A} variant [33] (Figure 1B). Furthermore, CD patients homozygous for the *ATG16L1*^{T300A} variant exhibit a higher abundance of the pathosymbiont groups, including *Enterobacteriaceae* (mostly *Escherichia coli*), *Bacteroidaceae* (mostly *Bacteroides fragilis*) and *Fusobacteriaceae*, in the inflamed ileum compared with the patients homozygous for the WT *ATG16L1* allele [34].

Autophagy in host cells can be influenced by the gut microbiota composition. It was shown that fecal microbiota transplantation induces an increase in autophagy-related protein levels in the intestinal mucosa of piglets, suggesting that intestinal microbiota modulation may influence mucosal autophagy [35]. Bacterial metabolites have a major effect on energy homeostasis and also on autophagy in colonic epithelial cells [36]. In particular, germ-free mice exhibit altered energy metabolism, leading to enhanced autophagy in colonic epithelial cells compared to conventionally raised control mice [36]. Colonization of germ-free mice with the microbiota derived from conventionally raised mice or with *Butyrivibrio fibriosolvens*, a butyrate-producing bacterial strain, restores autophagy in colonic epithelial cells to normal levels [36].

We and others have shown that abnormal AIEC colonization suppresses autophagy by modulating microRNA (MIR/miRNA) levels in host cells [37,38]. Lu and co-authors revealed that *MIR106B* and *MIR93* levels are increased in various human cell lines upon AIEC infection, inhibiting *ATG16L1* expression and impairing autophagy-mediated AIEC elimination [38]. We also showed *in vitro* and *in*

vivo that AIEC induce an upregulation of *Mir30c* and *Mir130a* levels in IECs, leading to inhibition of ATG5 and ATG16L1 expression, respectively, and to impaired autophagy-mediated clearance of intracellular AIEC [37]. This consequently leads to abnormal intracellular replication of AIEC and enhanced AIEC-induced inflammation [37]. We also observed an inverse correlation between the levels of *MIR30C* and *MIR130A* and those of *ATG5* and *ATG16L1* mRNAs in the ileal mucosa of CD patients compared to control subjects or UC patients. Although the presence of AIEC in these human biopsies was not defined, this result suggested that AIEC might reduce autophagy to favor their own colonization in CD.

Together, these data highlighted how autophagy in host cells regulates intestinal microbial communities and limits the expansion of pathobionts, and how the pathobionts have adapted to subvert this process to evade host cells.

Autophagy and ER stress

Autophagy, unfolded protein response and ER stress are interconnected at many levels [39]. ER is the primary site for folding and quality control of proteins, and any perturbation that alters ER homeostasis can cause misfolded protein accumulation, leading to activation of unfolded protein response, autophagic response or apoptosis [39]. In response to extended ER stress, unfolded protein response activation induces Ca^{2+} release from the ER, which in turn activates the key regulator of autophagy AMPK (AMP-activated protein kinase) [40]. It was reported that ER stress activates ATF6 (activating transcription factor 6)-DAPK1 (death-associated protein kinase 1) signaling in IECs, enhancing autophagic killing of intracellular bacteria [12]. Recently, it was shown that ER stress upregulates *MIR346* level in both epithelial and squamous cell lines, leading to enhanced translation of *GSK3B* (glycogen synthase kinase 3 beta) mRNA and consequently increased GSK3B protein level. This favors the dissociation between BCL2 (B-cell lymphoma 2) and BECN1 (beclin 1), thus promoting mitophagy, a selective degradation of mitochondria by autophagy, and reducing levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) [41] (Figure 1C).

Autophagy can reduce ER stress in various inflammatory and immune diseases [42]. In a mouse model of DSS-induced colitis, pharmacological or genetical inhibition of TREM1 (triggering receptor expressed on myeloid cells 1), known to amplify inflammation in several diseases, enhances both macroautophagy and chaperone-mediated autophagy by inducing MTOR (mechanistic target of rapamycin kinase) deregulation, thus compensating the unfolded protein response to reduce ER stress [43]. This also re-establishes gut microbiota homeostasis, thus preventing colonic inflammation and attenuating experimental colitis severity [43]. Dysfunctional autophagy leads to increased ER stress in murine IECs [44–46]. A correlation between the presence of the *ATG16L1*^{T300A} variant and ER stress in Paneth cells and increased AIEC colonization in patients with quiescent CD was reported [46]. *Atg16l1*^{ΔIEC} mice develop spontaneously CD-like transmural ileitis, and this is mediated *via* impaired clearance of the aggregates of the ER stress sensor ERN1/

IRE1A (ER to nucleus signaling 1) during ER stress in Paneth cells [44]. ERN1 accumulation was also observed in intestinal epithelial crypts of healthy individuals and CD patients homozygous for the *ATG16L1*^{T300A} allele [44]. Mechanistically, in mouse IECs experiencing ER stress, when autophagy is defective, ERN1 is not recruited to autophagosomes, which is mediated *via* its interaction with the autophagy receptor OPTN (optineurin), and thus is not degraded by autophagy [44] (Figure 1G). Together, these results showed that the impaired clearance of ERN1 aggregates during ER stress due to defective autophagy may predispose to IBD [44].

Moreover, stimulation of NOD and TNF receptors in IECs in a mouse model of DSS-induced colitis leads to ATG16L1 phosphorylation specifically at serine 218 by CHUK/IKKA (conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase), thus protecting ATG16L1 from CASP3-dependent cleavage and limiting ER stress activation [47] (Figure 1E). However, in mice expressing inactivable CHUK specifically in IECs, ATG16L1 degradation is enhanced as observed with the *ATG16L1*^{T300A} protein, leading to increased ER stress response [47]. This consequently increases CASP12 level, resulting in CASP1 activity inhibition and decreased secretion of the cytoprotective IL18, thus delaying epithelial regeneration and enhancing inflammation [47]. This study shows a novel mechanism by which CHUK prevents ER stress and inflammation *via* limiting degradation of the CD-associated *ATG16L1*^{T300A} protein.

ER stress and defective autophagy can act in synergy to promote IBD development [45]. Indeed, mice deficient in both *Atg16l1* and *Xbp1* (X-box binding protein 1) specifically in IECs (*Atg16l1*ΔIEC/*Xbp1*ΔIEC) develop more severe colitis compared to *Atg16l1*ΔIEC or *Xbp1*ΔIEC mice [45]. However, all *Atg16l1*ΔIEC, *Xbp1*ΔIEC and *Atg16l1*ΔIEC/*Xbp1*ΔIEC mice exhibit increased accumulation and hyper-activation of ERN1 [45], which seems to be due to defective ERN1 degradation by autophagy [44]. Primary IECs from CD patients carrying several risk variants implicated in both autophagy and ER stress, but not in autophagy alone, exhibit significantly higher ER stress response after ER stress induction but not at the basal level, indicating that the genetic predispositions in both pathways should be considered when looking at functional level [48].

Autophagy and mitochondrial ROS secretion

Autophagy, especially mitophagy, by eliminating damaged or superfluous mitochondria, plays a major role in limiting ROS accumulation. Mutations in the autophagy-related genes or autophagy deficiency have an impact on ROS levels *via* the impaired elimination of dysfunctional mitochondria in several cell types [49,50]. Murine macrophages expressing dysfunctional ATG16L1 produce higher amount of ROS following lipopolysaccharide (LPS) stimulation compared to WT macrophages [51]. Consistently, ROS production by *Atg16l1*-deficient murine DCs is increased compared to WT DCs either at baseline or upon *Salmonella* Typhimurium infection, and this is associated with an increased number of mitochondria probably due to impaired mitophagy [52]. In regulating ROS level, autophagy has an impact on cytokine secretion [53]. Indeed, in human intestinal epithelial T84 cells depleted in *NOD2* or

ATG16L1 gene, disruption of mitochondrial functions leads to increased IL8 production in response to commensal *E. coli* compared to WT cells [54]. Furthermore, autophagy deficiency increases secretion of the pro-inflammatory cytokine MIF (macrophage migration inhibitory factor) by macrophages both basally and in response to bacterial LPS in a mitochondrial ROS-dependent manner [55]. Macrophages depleted in the autophagy gene *Map1lc3b* (microtubule-associated protein 1 light chain 3B) exhibit dysfunctional mitochondria, associated with increased ROS production, leading to enhanced IL1B and IL18 secretion in response to LPS [56].

Autophagy and ROS are involved in intestinal stem cell (ISC) maintenance [57] and IEC defense against intracellular bacteria [13] (Figure 1I). Indeed, *Atg5*Δ*IEC* mice exhibit a fewer number of ISCs, associated with higher ROS level and defective ISC-associated intestinal recovery after irradiation, compared to WT mice [57]. Treatment of *Atg5*Δ*IEC* mice with an antioxidant rescues the defect in ISC-associated intestinal recovery, suggesting that autophagy, by reducing excessive ROS level, allows the maintenance of ISCs and intestinal regeneration [57].

Finally, in modulating autophagy, intestinal microbiota may influence ROS production. Indeed, trimethylamine-N-oxide, a choline-derived metabolite produced by gut microbiota, *via* inhibiting *ATG16L1*, *SQSTM1* (sequestosome 1) and *LC3-II*, increases ROS production in a dose and time dependent manner, thus explaining its involvement in IBD [58].

Autophagy and inflammasome activation

Previous studies showed that dysfunctional autophagy leads to abnormal inflammasome activation, which is associated with increased CASP1 activity, elevated IL1B and IL18 production and higher susceptibility to experimental intestinal inflammation in mice [59,60]. Recently, it was shown that mice with macrophage-specific *Atg5* depletion or knock-in mice expressing the *ATG16L1*^{T300A} variant exhibit increased inflammasome-mediated IL1B secretion compared to their controls, leading to more severe endotoxin-induced uveitis, an eye disease frequently developed by CD patients [61]. Murine macrophages deficient in the anti-inflammatory cytokine IL10 exhibit impaired mitophagy together with damaged mitochondrial accumulation, increased ROS production and aberrant inflammasome activation upon LPS stimulation [62]. Macrophages from *il10*^{-/-} mice or IBD patients with a null mutation in the *IL10R* (interleukin 10 receptor) gene exhibit damaged mitochondrial accumulation, associated with dysregulated NLRP3 (NLR family pyrin domain containing 3) inflammasome activation and elevated IL1B production [62]. These results suggested that IL10 prevents the development of intestinal inflammation, at least in part, *via* promoting mitophagy to limit inflammasome activation and inflammatory responses [62]. Autophagy-mediated inhibition of inflammasome activation was also reported as a novel mechanism underlying the role of EIF2AK4 in controlling intestinal inflammation [63]. Indeed, upon amino acid starvation, EIF2AK4 activation exerts a protective effect on DSS-induced colitis in mice by inducing autophagy, thus reducing ROS-dependent inflammasome activation in ITGAX/CD11c⁺ antigen-presenting cells and IECs and inhibiting intestinal

inflammation [63] (Figure 1K). *Eif2ak4* deficiency specifically in CD11c⁺ antigen-presenting cells or IECs in mice results in impaired autophagy activation, leading to increased mitochondrial ROS level and subsequently to increased susceptibility to DSS-induced colitis [63] (Figure 1K). Recently, the CD susceptibility genes *PTPN2* (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2) and *PTPN22* have been implicated in the regulation of autophagy and inflammasome activities [64,65]. It has been reported that a loss-of-function variant in *PTPN2* gene is a risk factor for CD, while a gain-of-function variant in *PTPN22* gene is associated with reduced risk of CD [66]. *PTPN22* dephosphorylates NLRP3 inflammasome to limit the sequestration of NLRP3 into autophagosomes to be degraded in autolysosomes [64] (Figure 1J). In human macrophages and murine bone marrow-derived DCs, loss of *PTPN22* leads to enhanced NLRP3 phosphorylation and subsequent NLRP3 degradation, thus decreasing IL1B secretion [64]. Loss of functional autophagy counteracts the reduction of NLRP3 activation observed in *PTPN22*-deficient cells, leading to increased IL1B secretion [64] (Figure 1J). *PTPN2*, involved in autophagy regulation, was shown to regulate inflammasome activation and IL1B secretion by limiting the phosphorylation of the adaptor molecule ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), which is required for inflammasome assembly. In mice, loss of *Ptpn2* in myeloid cells results in increased susceptibility to DSS-induced colitis due to increased inflammasome assembly and elevated IL1B production [65] (Figure 1J). Autophagy and inflammasome activation are recently linked *via* the key inflammatory regulator NFκB (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells) [67]. Indeed, NFκB activates expression of the selective autophagy receptor *SQSTM1*, promoting the mitophagy-mediated elimination of damaged mitochondria that secrete NLRP3-activating signals, thus inhibiting inflammasome activation and IL1B production [67] (Figure 1J). Recently, Mehto *et al.* showed for the first time that IRGM/IRGM1 mediates its anti-inflammatory activity by suppressing the activation of NLRP3 inflammasomes *via* at least two distinct mechanisms: (i) IRGM/IRGM1 physically interacts with NLRP3 inflammasome components and prevents inflammasome assembly, and (ii) IRGM/IRGM1 interacts with *SQSTM1* and mediates *SQSTM1*-dependent selective autophagic degradation of NLRP3 inflammasome components [68] (Figure 1J). Using *IRGM*-depleted human THP-1 macrophages and *irgm1*^{-/-} mice, it was shown that IRGM/IRGM1, by restricting inflammasome activity, protects from inflammation-induced cell death and suppresses DSS-induced colitis [68]. This work importantly showed a direct role of IRGM in suppressing inflammation and suggested that the CD-associated *IRGM* risk variant fails to do so, thus exacerbating inflammasome activity and the subsequent inflammation.

Whereas most of the studies on the cross-talk between autophagy and inflammasome have reported that autophagy inhibits inflammasome activation to prevent excessive inflammation, ROS and inflammasome can be involved in the regulation of autophagy activation. Indeed, NLRP3 was identified as a novel binding partner of the autophagy inhibitor MTOR [69]. Under inflammatory conditions, NLRP3 inflammasome binds to and promotes MTOR phosphorylation, inhibiting

autophagy and impairing the autophagy-mediated elimination of pro-inflammatory mediators and consequently exacerbating inflammation [69]. Hypoxia, an important environmental factor that influences IBD development, can counteract intestinal inflammation in a mouse model of DSS-induced colitis or in *il10*^{-/-} mice by reducing NLRP3-MTOR binding, thus activating the autophagy-mediated degradation of NFκB signaling mediators and reducing expression of pro-inflammatory genes [69]. However, it was reported that during *Legionella pneumophila* infection, inflammasome activation promotes autophagy, thus facilitating bacterial clearance [70]. Furthermore, in response to intracellular pathogens, CASP4 is activated, leading to inflammasome activation, thus positively regulating autophagosome biogenesis and trafficking to lysosomes in macrophages [71]. This consequently increases xenophagy-mediated pathogen elimination [71].

Therapies involving the modulation of autophagy and NLRP3 inflammasome to alleviate IBD have been largely studied. Administration of andrographolide, a herbal extract isolated from a Southeast Asian plant, to mice with DSS-induced colitis enhances mitophagy in peritoneal macrophages, leading to NLRP3 inflammasome inhibition and subsequently amelioration of colitis [72]. Agonist-mediated activation of cannabinoid receptor 2, a G protein-coupled receptor mainly located on immune cells and has been used to treat IBD, increases autophagy, which in turn inhibits NLRP3 inflammasome activation and attenuates DSS-induced colitis in mice [73]. Conversely, inhibition of NLRP3 inflammasome could be an efficient strategy to promote autophagy activation. Administration of Ginsenoside Rd, an anti-inflammatory molecule, was reported to inactivate NLRP3 inflammasome, thus inducing SQSTM1-driven mitophagy, leading to amelioration of DSS-induced colitis in mice [74].

Together, these studies showed a mutual regulation between autophagy and inflammasome, and raised the possibility to use NLRP3 inhibitors that induce autophagy or autophagy activators that inhibit inflammasome as potential therapeutic molecules for IBD treatment.

Autophagy and innate and adaptive immune responses

The role of autophagy in maintaining intestinal immune homeostasis has been largely investigated. Previous studies have shown that autophagy is required for intracellular bacterial handling, inhibiting pro-inflammatory cytokine production in IECs and immune cells, and that the CD-associated variants in the autophagy-associated genes fail to do so [2,5] (Figure 1D and J). Recently, it was shown that primary *Atg16l1*-deficient murine macrophages and primary human macrophages harboring the *ATG16L1*^{T300A} variant exhibit increased ROS production, impaired mitophagy and diminished fusion of *Salmonella* Typhimurium-containing vesicles with LAMP1 (lysosomal-associated membrane protein 1)-labeled lysosomes, leading to impaired bacterial clearance and reduced MHC class II antigen processing [33]. Mice with *Atg16l1* deficiency in myeloid cells show exacerbated DSS-induced colitis with increased ratio of pro-inflammatory to anti-inflammatory macrophages, enhanced pro-inflammatory cytokine production, and elevated IgA-

coated intestinal bacterial numbers [33]. Using bone marrow-derived macrophages from transgenic mice overexpressing *Lrrk2* infected with *Mycobacterium leprae*, LRRK2 was shown to bind to BECN1 to induce BECN1 degradation, thus inhibiting autophagy [75]. Moreover, increased LRRK2 expression, as given by the CD-associated risk variant in *LRRK2* gene, leads to enhanced NFκB activation induced by CLEC7A/Dectin-1, a recently discovered pattern-recognition receptor (PRR), and consequently excessive pro-inflammatory cytokine secretion [75]. LRRK2 inhibitors decrease CLEC7A-induced TNF production by mouse DCs and ameliorate DSS-induced colitis in control and *Lrrk2* transgenic mice, and inhibit TNF production by DCs from CD patients [75]. Although the implication of IRGM in xenophagy-mediated intracellular bacterial restriction and regulation of inflammation has been documented, the exact underlying molecular mechanism was just recently revealed. Indeed, IRGM functions as a key player in the formation and activation of the autophagy initiation complex, including ULK1 and BECN1, while at the same time physically couples to NOD2 and ATG16L1, and this is crucial for the antimicrobial and anti-inflammatory functions of autophagy [76] (Figure 1D).

Early onset of CD was recently associated with Niemann-Pick disease type C (NPC), a neurodegenerative lysosomal lipid storage disorder, in which the *NPC1* (NPC intracellular cholesterol transporter 1) gene involved in lipid transport is mutated [77]. Using peripheral blood monocyte-derived macrophages from patients having the *NPC1* gene mutation, it was shown that this mutation is linked to impaired autophagy due to a defective autophagosome formation. This consequently abolishes NOD2-mediated handling of intracellular bacteria, and this is similar to the effects given by the CD-associated variants in *NOD2* or *XIAP* (X-linked inhibitor of apoptosis) gene [77]. *XIAP* binds and ubiquitinates the adaptor protein RIPK2 following muramyl dipeptide-mediated NOD2 activation, thus activating NFκB signaling pathway and cytokine production [77]. In contrast to *NOD2* and *XIAP* variants, *NPC1* variant does not influence NOD2-RIPK2-*XIAP*-dependent cytokine production [77]. The defect in bacterial clearance given by the *NPC1* variant can be overcome by pharmacological activation of autophagy [77]. Recently, it was revealed that inhibitors of apoptosis proteins, such as *XIAP*, are required for the fusion of autophagosome with lysosome during autophagy [78]. Inhibition or loss of function of inhibitor of apoptosis proteins results in impaired autophagic flux, responsible for defective mitophagy and impaired bacterial clearance, and increased secretion of TNF and IL1β, which may lead to CD development [78]. In addition to an efficient fusion of autophagosome with lysosome, a functional lysosome is also required to guarantee pathogen elimination. It was recently shown that GPR65 (G protein-coupled receptor 65), a H⁺-sensing G protein-coupled receptor encoded by an IBD susceptibility gene, plays a role in maintaining lysosomal pH and thus lysosomal function, preserving autophagy and pathogen defense [79]. Epithelial cells or lymphoblasts from IBD patients carrying the *GPR65/I231L* missense variant exhibit aberrant lysosomal acidification, which results in lysosomal dysfunction, and impaired autophagy-mediated intracellular bacterial clearance [79]. Mice

with *Gpr65* deficiency are more susceptible than WT mice to *Citrobacter rodentium*-induced intestinal disease, as shown by higher levels of *C. rodentium* in the caecum, colon and feces and more severe colonic inflammation with enhanced infiltration of T cells [79].

However, other studies have reported that autophagy deficiency increases resistance to infection with *C. rodentium* [80,81]. Marchiando *et al.* reported that compared to WT mice, *Atg16l1[HM]* mice are more resistant to *C. rodentium* infection, displayed by reduced number of *C. rodentium* associated to the colon and caecum, increased survival, decreased weight loss and diarrheal disease and protection from colonic inflammation [80]. Mechanistically, this protection is due to enhanced immune response in *Atg16l1[HM]* mice and is dependent on monocytes and NOD2 [80]. Similarly, *Atg16l1[HM]* mice are protected against *C. rodentium* infection via enhanced IFN-I response to the gut microbiota [81]. The same results were obtained in *atg4b^{-/-}* and *lc3b^{-/-}* mice, but not in mice deficient in *Atg16l1* specifically in myeloid cells, indicating that the autophagy-mediated protection against *C. rodentium* requires myeloid cells [81]. These studies suggested that autophagy-associated gene variants may have conferred the host a protection against certain pathogen infections.

Recently, an unexpected role of ATG16L1 in regulating IL22 signaling in the intestinal epithelium via modulating CGAS (cyclic GMP-AMP synthase)-TMEM173/STING (stimulator of interferon genes protein)-IFN-I pathway was revealed [82]. Aden *et al.* showed that IL22 stimulation results in transient ER stress, thus activating IFN-I signaling via CGAS-TMEM173/STING in intestinal organoids, and this is increased in those derived from *Atg16l1[ΔIEC]* mice [82]. This consequently exacerbates TNF production and TNF-induced cell death in *Atg16l1*-deficient intestinal organoids. Systemic treatment of *Atg16l1[ΔIEC]* mice with IL22 aggravates intestinal inflammation and causes excessive necroptotic intestinal cell death, and these effects are ameliorated by inhibiting IFN-I signaling [82]. This study suggested that IL22 signals together with autophagy-associated risk factors may contribute to tissue damage and inflammation in CD. IFN-I responses and cytokine secretion may be also regulated by selective autophagy-mediated control of the turnover of the innate adaptor TIRAP/TRIF (toll-interleukin 1 receptor [TIR] domain-containing adaptor protein) in response to TLR (toll-like receptor) activation [83] (Figure 1). Indeed, the autophagy receptors SQSTM1 and TAX1BP1 (Tax1 binding protein 1) target TIRAP for degradation by selective autophagy, and that *Atg16l1*-deficient murine bone marrow-derived macrophages or DCs exhibit TIRAP accumulation, driving TIRAP-dependent inflammatory signaling upon TLR stimulation with increased IFN β 1 and IL1 β production [83] (Figure 1). Consistently, elevated production of IFN β 1 and IL1 β upon LPS treatment by human macrophages carrying the *ATG16L1^{T300A}* allele compared to those harboring the WT *ATG16L1* allele was observed [83].

Another IBD-associated *MTMR3* (myotubularin-related protein 3) risk allele was shown to amplify the PRR-induced innate immune response by decreasing autophagy [84]. Indeed, myeloid cells from healthy individuals carrying the IBD-associated polymorphism in the *MTMR3* gene exhibit increased *MTMR3* expression, leading to decreased PRR-induced autophagy by reducing cellular levels of

phosphatidylinositol-3-phosphate, which are associated with autophagy initiation and maturation. This consequently leads to increased PRR-induced CASP1 activation and cytokine secretion [84].

Selective autophagy receptors, such as OPTN, are required for an appropriate regulation of cytokine response. Indeed, bone marrow-derived macrophages from *Optn*-deficient mice present a reduced ability to secrete TNF and IL6 upon stimulation with heat-killed *E. coli*, due to a mis-trafficking of these cytokines to lysosomes [85]. *Optn*-deficient mice are more susceptible to *C. rodentium*-induced colitis, associated with greater colitis score, reduced TNF level in the serum and impaired neutrophil recruitment to the site of infection compared to WT mice [85]. Transcriptomic analysis of CD and control macrophages revealed that the gene encoding OPTN is under-expressed in approximately 10% of CD patients, and this is associated with decreased OPTN protein level and reduced cytokine secretion by macrophages upon bacterial infection [86]. Moreover, neutrophils can be the target of CD-associated AIEC, which invade and replicate within these cells [87]. Indeed, AIEC reside in non-acidic autolysosomes without being degraded, suggesting that AIEC either delay or prevent the full maturation of autolysosomes [87]. This is correlated with the induction of autophagic cell death and exacerbated IL8 production [87].

It was recently shown that ATG16L1 can act as an important player in innate immune defense by limiting pathogen dissemination during infection via an autophagy-independent mechanism. Indeed, ATG16L1 and its binding partners ATG5 and ATG12 are required for the repair of plasma membrane damage caused by bacterial pore-forming toxins, thus maintaining cell viability [88]. ATG16L1 was also found to restrict cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* by limiting plasma membrane damage mediated by listeriolysin O, a pore-forming toxin expressed by the bacterium [88]. Importantly, expression of the CD-associated *ATG16L1^{T300A}* risk allele leads to a defect in plasma membrane damage repair upon *L. monocytogenes* infection and increased cell-to-cell spread by the bacterium [88]. Thus, it should be kept in mind that the autophagy-related genetic variants can contribute to IBD pathogenesis via autophagy-independent pathways or mechanisms.

In addition to its role in innate immunity, autophagy has been implicated in adaptive immunity. After the degradation of intracellular pathogens in autolysosomes, the produced antigens are presented by MHC class II molecules to T cells to induce adaptive immune responses, a process that can be promoted by autophagy [89]. Infection of DCs by AIEC activates autophagy, thus contributing to the elimination of intracellular AIEC and to generation of MHC class II antigen-specific CD4⁺ T cell response [90]. Furthermore, autophagy negatively modulates adaptive responses by destabilizing the immunologic synapse, which is the DC-T cell contact site [91]. Depletion of *Atg16l1* or *Irgm1* in DCs in mice results in hyperstable DC-T cell interaction, increased T cell activation, and activation of a Th17 response [91]. DCs from CD patients carrying the *ATG16L1^{T300A}* allele have a similar hyperstable DC-T cell interaction [91]. This suggests that the IBD-associated genetic variants in autophagy-associated genes might lead to increased adaptive immunity, enhancing disease development.

Several studies have revealed that T cells are highly sensitive to alterations of autophagy process [92]. Indeed, murine models with T-cell-specific defective autophagy exhibit decreased numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and alteration of T cell proliferation, revealing the key role of autophagy in T cell homeostasis [93–95] (Figure 1K). Moreover, autophagy substantially contributes to effector CD8⁺ T cell survival and memory formation [96–98] (Figure 1K). It was recently demonstrated that autophagy mediated by the autophagy receptor TAX1BP1 is implicated in the control of cellular metabolism enabling T cell activation, revealing the crucial relationship between immune activation, autophagy and metabolism of immune cells [99] (Figure 1K). Th cells play a critical role in intestinal immune responses, and their number and behavior vary during IBD [100]. Autophagy is directly involved in favoring regulatory T (Treg) cell survival and in restricting pro-inflammatory Th2 cell expansion, and T cell-specific autophagy inhibition leads to changes in the balance between different Th cell types in the intestine [95]. Mice lacking *Atg16l1* in CD4⁺ T cells develop spontaneously intestinal inflammation characterized by Th2 responses against dietary and gut microbiota antigens and by a loss of Treg cells, suggesting that autophagy plays a role in promoting the survival of Treg cells, limiting mucosal Th2 cell expansion and thus limiting Th2 type inflammation [95] (Figure 1K). Mice deficient in *Eif2ak4* specifically in antigen-presenting cells or IECs exhibit exacerbated Th17 responses and intestinal inflammation, and this is mechanistically due to impaired autophagy, enhanced inflammasome activation and IL1B production [63] (Figure 1K).

Recently, it was reported that a functional autophagy is required for the sensing of microbiota-derived protective signals to initiate an efficient immune response and to inhibit intestinal inflammation [101]. Indeed, the commensal bacterium *Bacteroides fragilis* secretes the immunomodulatory molecule polysaccharide A through outer membrane vesicles (OMVs), which is then sensed by DCs through TLR2 [102], resulting in enhanced conversion of naïve CD4⁺ T cells into FOXP3⁺ (forkhead box P3) Treg cells that produce IL10 and subsequently protection of mice from experimental colitis [102]. OMVs require ATG16L1 and NOD2 to activate the LC3-associated phagocytosis (LAP), a non-canonical autophagy pathway specifically activated by microbial ligands, in murine bone marrow-derived DCs [101] (Figure 1L). Upon oral administration of OMVs, although WT mice are protected from 2,4-dinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis, mice deficient in *Atg16l1* specifically in CD11⁺ DCs exhibit increased weight loss and elevated mortality similarly to those that did not receive OMVs [101]. Moreover, the production of IL10 by CD4⁺FOXP3⁺ Treg cells is significantly reduced in mice deficient in *Atg16l1* in CD11⁺ DCs versus WT mice [101]. Murine bone marrow-derived DCs deficient in *Nod2* are also defective in inducing IL10 production by FOXP3⁺ Treg cells in response to *B. fragilis*-derived OMVs during *in vitro* co-culture [101]. Finally, in contrast to those carrying the WT alleles, monocyte-derived DCs from CD patients or healthy controls homozygous for the *ATG16L1*^{T300A} variant pulsed with *B. fragilis* OMVs and co-cultured with syngeneic CD4⁺ T cells are unable to induce IL10 production by FOXP3⁺ Treg cells. These findings suggest that IBD-associated genetic variants may lead to defective sensing of

protective signals from the microbiota, favoring the disease development [101] (Figure 1L).

Collectively, these studies highlighted the molecular mechanisms contributing to the modulation of innate and adaptive immune cell function by autophagy, thus influencing the outcome immune responses.

Future directions and conclusion

As discussed in this review, defective autophagy may have a strong impact on the course of IBD, *via* disruption of intestinal homeostasis, affecting gut microbiota composition, impairing intracellular bacterial clearance and amplifying intestinal inflammation. Thus, efforts have been made to develop IBD treatments based on modulating autophagy.

Treatment with the rapamycin analogue everolimus, an inducer of autophagy, ameliorates CD-like ileitis in *il10*^{-/-} mice [103] and improves CD symptoms [104,105]. Two case reports revealed an improvement of CD symptoms in two patients treated with everolimus and another rapamycin analogue named sirolimus by enhancing autophagy level [104,105]. However, in these contexts, the beneficial effects of rapamycin analogues may be given by the autophagy-independent immunosuppressive effects. The use of autophagy modulators as a therapy remains challenging given the low pharmacological specificity for their targets, the absence of specificity for a particular cell type and the autophagy-independent effects.

Thus, strategies to modulate specifically autophagy with no toxic effects should be developed to establish an efficient therapy for IBD treatment. Interestingly, some compounds derived from dietary products, such as vitamin D and curcumin, have been shown to induce autophagy [106,107]. Vitamin D deficiency is a critical factor in the pathology of IBD, and it was recently shown that treatment of IECs with vitamin D3 leads to increased autophagy activation [108]. This suggested that a vitamin D supplementation in IBD patients may palliate their deficiency and increase autophagy level, leading to beneficial effects. Similarly, it was reported that glutamine enhances autophagy in IECs both under basal and stress-induced conditions by regulating MTOR and MAPK/p38 pathways, thus limiting stress-induced cellular apoptosis [109]. Several studies have recently revealed that curcumin treatment, which has been shown to ameliorate pathology in animal models of IBD and in clinical studies [110], promotes autophagy *in vitro* and *in vivo via* diverse molecular mechanisms [111–113]. Andrographolide, a herbal extract, enhances mitophagy in macrophages, inhibiting NLRP3 inflammasome and ameliorating DSS-induced colitis [72]. Another herbal extract called celastrol extracted from the root of *Tripterygium wilfordii*, a traditional Chinese medicine, enhances autophagy by inhibiting the PI3K (phosphoinositide 3-kinase)-AKT-MTOR signaling pathway in colonic tissues of *il10*^{-/-} mice, thus limiting colonic inflammation [114]. These outcomes suggested that nutritional complementation of IBD patients with natural products that induce autophagy may alleviate the disease, and further investigations using large patient cohorts are needed to confirm this effect.

Given the multifactorial etiology of IBD and the fact that the underlying risk factors and pathophysiology being specific to

each patient, the development of efficient personalized approaches for disease treatment appears essential. The induction of autophagy in CD patients having autophagy-associated genetic defects to restore functional antimicrobial peptide secretion and antimicrobial activity in Paneth cells and to activate an efficient immune response could be an attractive therapeutic concept [115]. Gene therapy is also a potential therapeutic strategy to relieve, but also cure, IBD. Several miRNAs have been reported to suppress autophagy by inhibiting expression of autophagy-associated genes [106]. In this regard, we showed *in vitro* and *in vivo* that inhibition of *Mir30c* and *Mir130a* in IECs abolished the AIEC-induced autophagy inhibition, reestablishing an efficient AIEC clearance and inhibiting intestinal inflammation [37]. This suggested that targeting these miRNAs could be a strategy to treat specifically CD patients with abnormal AIEC colonization. The use of an autophagy-inducing peptide termed ‘Tat-BECN1’, which can be internalized and induce autophagy in various human cell types, has been also proposed to treat human diseases with defective autophagy [116]. However, the use of autophagy-inducing peptide or miRNA-based therapy to treat IBD remains problematic and requires the development of gut-specific delivery systems as well as demands further assessment on the effectiveness and security.

In conclusion, understanding the molecular mechanisms behind the impact of IBD-associated autophagy alleles and their interactions with other etiology factors required for disease manifestation, including the resident microbiota and environmental triggers, is crucial when developing new therapeutic strategies. It should be kept in mind that the IBD-associated autophagy gene variants are also present in healthy individuals, and their presence alone is not sufficient to induce IBD. Thus, the development of multiple pathway-integrated treatments, depending on each patient subset, may be a successful strategy to provide a cure for IBD. In particular, vectorized therapies to target and modulate autophagy specifically in IBD patients with defective autophagy should be highly considered.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie, Inserm (UMR1071) and INRA (USC 2018), the Agence Nationale de la Recherche of the French government through the program ‘Investissements d’Avenir’ (16-IDEX-0001 CAP 20-25) (to H.N.) and the European Union FP7 People Marie Curie International Incoming Fellowship (to H.N.).

References

- Carrière J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HTT. Infectious etiology of Crohn’s disease. *World J Gastroenterol*. [Internet] 2014;20:12102–12117. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25232246>
- Nguyen HTT, Lapaquette P, Bringer M-A, et al. Autophagy and Crohn’s disease. *J Innate Immun*. [Internet] 2013;5:434–443. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/345129>
- Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease [Internet]. *Nat Cell Biol*. 2018;20:521–527. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41556-018-0092-5>
- Kim S, Eun H, Jo E-K. Roles of autophagy-related genes in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Cells*. [Internet] 2019;8:77. Available from: <http://www.mdpi.com/2073-4409/8/1/77>
- Lapaquette P, Thi Thu Nguyen H, Faure M. L’autophagie garante de l’immunité et de l’inflammation. *médecine/sciences*. [Internet] 2017;33:305–311. Available from: <http://www.medecinesciences.org/10.1051/medsci/20173303018>
- Murthy A, Li Y, Peng I, et al. A Crohn’s disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature*. [Internet] 2014;506:456–462.
- Boada-Romero E, Serramito-Gómez I, Sacristán MP, et al. The T300A Crohn’s disease risk polymorphism impairs function of the WD40 domain of ATG16L1. *Nat Commun*. [Internet] 2016;7:11821. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27273576>
- Barker N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. [Internet] 2014;15:19–33.
- Michielan A, D’Inca R. Host-microbiome interaction in Crohn’s disease: A familiar or familial issue? *World J Gastrointest Pathophysiol*. [Internet] 2015;6:159–168. Available from: <http://www.wjgnet.com/2150-5330/full/v6/i4/159.htm>
- Night PK, Hu C-A-A, Ma TY. Autophagy enhances intestinal epithelial tight junction barrier function by targeting claudin-2 protein degradation. *J Biol Chem* [Internet]. 2015;290:7234–7246. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25616664>
- Zhang C, Yan J, Xiao Y, et al. Inhibition of autophagic degradation process contributes to claudin-2 expression increase and epithelial tight junction dysfunction in tnf- α treated cell monolayers. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017;18:157. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/1/157>
- Lopes F, Keita ÁV, Saxena A, et al. ER-stress mobilization of death-associated protein kinase-1-dependent xenophagy counteracts mitochondrial stress-induced epithelial barrier dysfunction. *J Biol Chem* [Internet]. 2018;293:3073–3087. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29317503>
- Saxena A, Lopes F, Poon KKH, et al. Absence of the NOD2 protein renders epithelia more susceptible to barrier dysfunction due to mitochondrial dysfunction. *Am J Physiol Liver Physiol* [Internet]. 2017;313:G26–38. Available from: <http://ajpgi.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpgi.00070.2017>
- Blander JM. Death in the intestinal epithelium—basic biology and implications for inflammatory bowel disease. *Febs J* [Internet]. 2016;283:2720–2730. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27250564>
- Matsuzawa-Ishimoto Y, Shono Y, Gomez LE, et al. Autophagy protein ATG16L1 prevents necroptosis in the intestinal epithelium. *J Exp Med*. [Internet] 2017;jem.20170558. DOI:10.1084/jem.20170558
- Pott J, Kabat AM, Maloy KJ. Intestinal epithelial cell autophagy is required to protect against TNF-induced apoptosis during chronic colitis in mice. *Cell Host Microbe*. [Internet] 2018;1–12. DOI:10.1016/j.chom.2017.12.017
- Levin AD, Koelink PJ, Bloemendaal FM, et al. Autophagy contributes to the induction of Anti-TNF induced macrophages. *J Crohns Colitis* [Internet]. 2016;10:323–329. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26417049>
- Shen T, Li S, Cai L, et al. Erbin exerts a protective effect against inflammatory bowel disease by suppressing autophagic cell death. *Oncotarget* [Internet]. 2018;9:12035–12049. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/23925>
- Yuan Y, Ding D, Zhang N, et al. TNF- α induces autophagy through ERK1/2 pathway to regulate apoptosis in neonatal necrotizing enterocolitis model cells IEC-6. *Cell Cycle*. [Internet] 2018;1. DOI:10.1080/15384101.2018.1482150
- Holly M, Smith J. Paneth cells during viral infection and pathogenesis. *Viruses*. [Internet] 2018;10:225. Available from: <http://www.mdpi.com/1999-4915/10/5/225>

- [21] Zhang Q, Pan Y, Yan R, et al. Commensal bacteria direct selective cargo sorting to promote symbiosis. *Nat Immunol*. [Internet] 2015;1–12. DOI:10.1038/ni.3233
- [22] Wang H, Zhang X, Zuo Z, et al. Rip2 is required for nod2-mediated lysozyme sorting in paneth cells. *J Immunol*. [Internet] 2017;1601583. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1601583>
- [23] Bel S, Pendse M, Wang Y, et al. Paneth cells secrete lysozyme via secretory autophagy during bacterial infection of the intestine. *Science*. [Internet] 2017;357:1047–1052. Available from: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aal4677>
- [24] Liu B, Gulati AS, Cantillana V, et al. Irgm1-deficient mice exhibit Paneth cell abnormalities and increased susceptibility to acute intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. [Internet] 2013;305:G573–G584. Available from: <http://ajpgi.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpgi.00071.2013>
- [25] Rogala AR, Schoenborn AA, Fee BE, et al. Environmental factors regulate Paneth cell phenotype and host susceptibility to intestinal inflammation in Irgm1-deficient mice. *Dis Model Mech*. [Internet] 2018;11:dmm031070. Available from: <http://dmm.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dmm.031070>
- [26] Tsuboi K, Nishitani M, Takakura A, et al. Autophagy protects against colitis by the maintenance of normal gut microflora and secretion of mucus. *J Biol Chem*. [Internet] 2015;290:20511–20526. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26149685>
- [27] Yang L, Liu C, Zhao W, et al. Impaired autophagy in intestinal epithelial cells alters gut microbiota and host immune responses. *Appl Environ Microbiol*. [Internet] 2018;84:AEM.00880–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30006408>
- [28] Lavoie S, Conway KL, Lassen KG, et al. The Crohn's disease polymorphism, ATG16L1 T300A, alters the gut microbiota and enhances the local Th1/Th17 response. *Elife*. [Internet] 2019;8:1–28. Available from: <https://elifesciences.org/articles/39982>
- [29] Bretin A, Carrière J, Dalmaso G, et al. Activation of the EIF2AK4-EIF2A/eIF2 α -ATF4 pathway triggers autophagy response to Crohn disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* infection. *Autophagy*. [Internet] 2016;12:770–783. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27802154>
- [30] Bretin A, Lucas C, Larabi A, et al. AIEC infection triggers modification of gut microbiota composition in genetically predisposed mice, contributing to intestinal inflammation. *Sci Rep*. [Internet] 2018;8:12301. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-30055-y>
- [31] Imhann F, Vich Vila A, Bonder MJ, et al. Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease. *Gut*. [Internet] 2018;67:108–119. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27802154>
- [32] Palm NW, de Zoete MR, Cullen TW, et al. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell*. [Internet] 2014;158:1000–1010.
- [33] Zhang H, Zheng L, McGovern DPB, et al. Myeloid ATG16L1 facilitates host–bacteria interactions in maintaining intestinal homeostasis. *J Immunol*. [Internet] 2017;198:2133–2146. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1601293>
- [34] Sadaghian Sadabad M, Regeling A, de Goffau MC, et al. The ATG16L1–T300A allele impairs clearance of pathosymbionts in the inflamed ileal mucosa of Crohn's disease patients. *Gut*. [Internet] 2015;64:1546–1552. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25253126>
- [35] Cheng S, Ma X, Geng S, et al. Fecal microbiota transplantation beneficially regulates intestinal mucosal autophagy and alleviates gut barrier injury. *mSystems*. [Internet] 2018;3:1–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30320222>
- [36] Donohoe DR, Garge N, Zhang X, et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab*. [Internet] 2011;13:517–526. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413111001434>
- [37] Nguyen HTT, Dalmaso G, Müller S, et al. Crohn's disease-associated adherent invasive *Escherichia coli* modulate levels of microRNAs in intestinal epithelial cells to reduce autophagy. *Gastroenterology*. [Internet] 2014;146:508–519.
- [38] Lu C, Chen J, Xu HG, et al. MIR106B and MIR93 prevent removal of bacteria from epithelial cells by disrupting ATG16L1-mediated autophagy. *Gastroenterology*. [Internet] 2014;146:188–199.
- [39] Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci*. [Internet] 2015;40:141–148.
- [40] Høyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, et al. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase Kinase- β , and Bcl-2. *Mol Cell* [Internet]. 2007;25:193–205. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276506008458>
- [41] Guo J, Yang Z, Yang X, et al. miR-346 functions as a pro-survival factor under ER stress by activating mitophagy. *Cancer Lett*. [Internet] 2018;413:69–81.
- [42] Cao SS. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. [Internet] 2015;21:636–644. Available from: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/21/3/636-644/4602937>
- [43] Kökten T, Gibot S, Lepage P, et al. TREM-1 inhibition restores impaired autophagy activity and reduces colitis in mice. *J Crohns Colitis*. [Internet] 2018;12:230–244. Available from: <https://academic.oup.com/ecco-jcc/article/12/2/230/4159885>
- [44] Tschurtschenthaler M, Adolph TE, Ashcroft JW, et al. Defective ATG16L1-mediated removal of IRE1 α drives Crohn's disease-like ileitis. *J Exp Med*. [Internet] 2017;214:401–422. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20160791>
- [45] Adolph TE, Tomczak MF, Niederreiter L, et al. Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature*. [Internet] 2013;503:272–276. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12599>
- [46] Deuring JJ, Fuhler GM, Konstantinov SR, et al. Genomic ATG16L1 risk allele-restricted Paneth cell ER stress in quiescent Crohn's disease. *Gut*. [Internet] 2014;63:1081–1091. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23964099>
- [47] Diamanti MA, Gupta J, Bennecke M, et al. IKK α controls ATG16L1 degradation to prevent ER stress during inflammation. *J Exp Med*. [Internet] 2017;214:423–437. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28082356>
- [48] Vanhove W, Nys K, Arijis I, et al. Biopsy-derived intestinal epithelial cell cultures for pathway-based stratification of patients with inflammatory bowel disease. *J Crohn's Colitis*. [Internet] 2018;12:178–187. Available from: <http://academic.oup.com/ecco-jcc/article/12/2/178/4210679>
- [49] Tal MC, Sasai M, Lee HK, et al. Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proc Natl Acad Sci*. [Internet] 2009;106:2770–2775. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0807694106>
- [50] Billmann-Born S, Lipinski S, Böck J, et al. The complex interplay of NOD-like receptors and the autophagy machinery in the pathophysiology of Crohn disease. *Eur J Cell Biol*. [Internet] 2011;90:593–602.
- [51] Saitoh T, Fujita N, Jang MH, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature*. [Internet] 2008;456:264–268. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18849965>
- [52] Zhang H, Zheng L, Chen J, et al. The protection role of Atg16L1 in CD11c + dendritic cells in murine colitis. *Immunobiology*. [Internet] 2017;222:831–841. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889159115004717>
- [53] Qian M, Fang X, Wang X. Autophagy and inflammation. *Clin Transl Med*. [Internet] 2017;6:24. Available from: <http://clintransmed.springeropen.com/articles/10.1186/s40169-017-0154-5>
- [54] Saxena A, Lopes F, McKay DM. Reduced intestinal epithelial mitochondrial function enhances in vitro interleukin-8 production in response to commensal *Escherichia coli*. *Inflamm Res*. [Internet] 2018. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30030553>

- [55] Lee JPW, Foote A, Fan H, et al. Loss of autophagy enhances MIF/macrophage migration inhibitory factor release by macrophages. *Autophagy*. [Internet] 2016;12:907–916. Available from.
- [56] Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol*. [Internet] 2011;12:222–230. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.1980>
- [57] Asano J, Sato T, Ichinose S, et al. Intrinsic autophagy is required for the maintenance of intestinal stem cells and for irradiation-induced intestinal regeneration. *Cell Rep*. [Internet] 2017;20:1050–1060.
- [58] Yue C, Yang X, Li J, et al. Trimethylamine N-oxide prime NLRP3 inflammasome via inhibiting ATG16L1-induced autophagy in colonic epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. [Internet] 2017;490:541–551.
- [59] Takahama M, Akira S, Saitoh T. Autophagy limits activation of the inflammasomes. *Immunol Rev*. [Internet] 2018;281:62–73. Available from.
- [60] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. [Internet] 2002;10:417–426. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191486>
- [61] Santeford A, Wiley LA, Park S, et al. Impaired autophagy in macrophages promotes inflammatory eye disease. *Autophagy*. [Internet] 2016;12:1876–1885.
- [62] Ip WKE, Hoshi N, Shouval DS, et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science*. [Internet] 2017;356:513–519. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28473584>
- [63] Ravindran R, Loebbermann J, Nakaya HI, et al. The amino acid sensor GCN2 controls gut inflammation by inhibiting inflammasome activation. *Nature*. [Internet] 2016;531:523–527.
- [64] Spalinger MR, Lang S, Gottier C, et al. PTPN22 regulates NLRP3-mediated IL1B secretion in an autophagy-dependent manner. *Autophagy*. [Internet] 2017;13:1590–1601.
- [65] Spalinger MR, Manzini R, Hering L, et al. PTPN22 regulates inflammasome activation and controls onset of intestinal inflammation and colon cancer. *Cell Rep*. [Internet] 2018;22:1835–1848. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221124718301013>
- [66] Pike KA, Tremblay ML. Protein tyrosine phosphatases: regulators of CD4 T cells in inflammatory bowel disease. *Front Immunol*. [Internet] 2018;9:1–14. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02504/full>
- [67] Zhong Z, Umemura A, Sanchez-Lopez E, et al. NF- κ B restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria. *Cell*. [Internet] 2016;164:896–910. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415017213>
- [68] Mehto S, Jena KK, Nath P, et al. The crohn's disease risk factor IRGM limits NLRP3 inflammasome activation by impeding its assembly and by mediating its selective autophagy. *Mol Cell*. [Internet] 2019;73:429–445.e7.
- [69] Cosin-Roger J, Simmen S, Melhem H, et al. Hypoxia ameliorates intestinal inflammation through NLRP3/mTOR downregulation and autophagy activation. *Nat Commun*. [Internet] 2017;8:1–13.
- [70] Byrne BG, Dubuisson J-F, Joshi AD, et al. Inflammasome components coordinate autophagy and pyroptosis as macrophage responses to infection. *MBio*. [Internet] 2013;4:1–12. Available from: <http://mbio.asm.org/cgi/doi/10.1128/mBio.00620-12>
- [71] Krause K, Caution K, Badr A, et al. CASP4/caspase-11 promotes autophagosome formation in response to bacterial infection. *Autophagy*. [Internet] 2018;1–15. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15548627.2018.1491494>
- [72] Guo W, Sun Y, Liu W, et al. Small molecule-driven mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome inhibition is responsible for the prevention of colitis-associated cancer. *Autophagy*. [Internet] 2014;10:972–985. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24879148>
- [73] Shao B-Z, Wei W, Ke P, et al. Activating cannabinoid receptor 2 alleviates pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis via activation of autophagy and inhibiting NLRP3 inflammasome. *CNS Neurosci Ther*. [Internet] 2014;20:1021–1028. Available from.
- [74] Liu C, Wang J, Yang Y, et al. Ginsenoside Rd ameliorates colitis by inducing p62-driven mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome inactivation in mice. *Biochem Pharmacol*. [Internet] 2018;155:366–379.
- [75] Takagawa T, Kitani A, Fuss I, et al. An increase in LRRK2 suppresses autophagy and enhances Dectin-1-induced immunity in a mouse model of colitis. *Sci Transl Med*. [Internet] 2018;10:eaan8162. Available from: <http://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.aan8162>
- [76] Chauhan S, Mandell MA, Deretic V. IRGM governs the core autophagy machinery to conduct antimicrobial defense. *Mol Cell*. [Internet] 2015;58:507–521.
- [77] Schwerdt T, Pandey S, Yang H-T, et al. Impaired antibacterial autophagy links granulomatous intestinal inflammation in Niemann–pick disease type C1 and XIAP deficiency with NOD2 variants in Crohn's disease. *Gut*. [Internet] 2017;66:1060–1073. Available from: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2015-310382>
- [78] Gradzka S, Thomas OS, Kretz O, et al. Inhibitor of apoptosis proteins are required for effective fusion of autophagosomes with lysosomes. *Cell Death Dis*. [Internet] 2018;9:529.
- [79] Lassen KG, McKenzie CI, Mari M, et al. Genetic coding variant in GPR65 alters lysosomal pH and links lysosomal dysfunction with colitis risk. *Immunity*. [Internet] 2016;44:1392–1405.
- [80] Marchiando AM, Ramanan D, Ding Y, et al. A deficiency in the autophagy gene Atg16L1 enhances resistance to enteric bacterial infection. *Cell Host Microbe*. [Internet] 2013;14:216–224. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23954160>
- [81] Martin PK, Marchiando A, Xu R, et al. Autophagy proteins suppress protective type I interferon signalling in response to the murine gut microbiota. *Nat Microbiol*. [Internet] 2018;3:1131–1141. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41564-018-0229-0>
- [82] Aden K, Tran F, Ito G, et al. ATG16L1 orchestrates interleukin-22 signaling in the intestinal epithelium via cGAS–STING. *J Exp Med*. [Internet] 2018;215:2868–2886. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20171029>
- [83] Samie M, Lim J, Verschueren E, et al. Selective autophagy of the adaptor TRIF regulates innate inflammatory signaling. *Nat Immunol*. [Internet] 2018;19:246–254.
- [84] Lahiri A, Hedl M, Abraham C. MTMR3 risk allele enhances innate receptor-induced signaling and cytokines by decreasing autophagy and increasing caspase-1 activation. *Proc Natl Acad Sci*. [Internet] 2015;112:10461–10466. Available from: <http://www.pnas.org/content/112/33/10461.abstract>
- [85] Chew TS, O'Shea NR, Sewell GW, et al. Optineurin deficiency in mice contributes to impaired cytokine secretion and neutrophil recruitment in bacteria-driven colitis. *Dis Model Mech*. [Internet] 2015;8:817–829. Available from: <http://dmm.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dmm.020362>
- [86] Smith AM, Sewell GW, Levine AP, et al. Disruption of macrophage pro-inflammatory cytokine release in Crohn's disease is associated with reduced optineurin expression in a subset of patients. *Immunology*. [Internet] 2015;144:45–55. Available from.
- [87] Chargui A, Cesaro A, Mimouna S, et al. Subversion of autophagy in adherent invasive *Escherichia coli*-infected neutrophils induces inflammation and cell death. *PLoS One*. [Internet] 2012;7:e51727. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23272151>
- [88] Tan JM, Mellouk N, Osborne SE, et al. An ATG16L1-dependent pathway promotes plasma membrane repair and limits *Listeria monocytogenes* cell-to-cell spread. *Nat Microbiol*. [Internet] 2018;3:1472–1485.
- [89] Dengjel J, Schoor O, Fischer R, et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins.

- Proc Natl Acad Sci. [Internet] 2005;102:7922–7927. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0501190102>
- [90] Cooney R, Baker J, Brain O, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med.* [Internet] 2010;16:90–97.
- [91] Wildenberg ME, Vos ACW, Wolfkamp SCS, et al. Autophagy attenuates the adaptive immune response by destabilizing the immunologic synapse. *Gastroenterology.* [Internet] 2012;142:1493–503.e6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22370477>
- [92] Ma Y, Galluzzi L, Zitvogel L, et al. Autophagy and cellular immune responses. *Immunity.* [Internet] 2013;39:211–227.
- [93] Jia W, He Y-W. Temporal regulation of intracellular organelle homeostasis in T lymphocytes by autophagy. *J Immunol.* [Internet] 2011;186:5313–5322. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1002404>
- [94] Kovacs JR, Li C, Yang Q, et al. Autophagy promotes T-cell survival through degradation of proteins of the cell death machinery. *Cell Death Differ.* [Internet] 2012;19:144–152. Available from: <http://www.nature.com/articles/cdd201178>
- [95] Kabat AM, Harrison OJ, Riffelmacher T, et al. The autophagy gene Atg16l1 differentially regulates Treg and TH2 cells to control intestinal inflammation. *Elife.* [Internet] 2016;5:1–27. Available from: <https://elifesciences.org/articles/12444>
- [96] Puleston DJ, Zhang H, Powell TJ, et al. Autophagy is a critical regulator of memory CD8+ T cell formation. *Elife.* [Internet] 2014;3:1–21. Available from: <https://elifesciences.org/articles/03706>
- [97] Xu X, Araki K, Li S, et al. Autophagy is essential for effector CD8+ T cell survival and memory formation. *Nat Immunol.* [Internet] 2014;15:1152–1161. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.3025>
- [98] Schlie K, Westerbäck A, DeVorkin L, et al. Survival of effector CD8+ T cells during influenza infection is dependent on autophagy. *J Immunol.* [Internet] 2015;194:4277–4286. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1402571>
- [99] Whang MI, Tavares RM, Benjamin DI, et al. The ubiquitin binding protein TAX1BP1 mediates autophagosome induction and the metabolic transition of activated T cells. *Immunity.* [Internet] 2017;46:405–420.
- [100] Geremia A, Biancheri P, Allan P, et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev.* [Internet] 2014;13:3–10.
- [101] Chu H, Khosravi A, Kusumawardhani IP, et al. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science.* [Internet] 2016;352:1116–1120. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aad9948>
- [102] Shen Y, Torchia MLG, Lawson GW, et al. Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. *Cell Host Microbe.* [Internet] 2012;12:509–520. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312812002752>
- [103] Matsuda C, Ito T, Song J, et al. Therapeutic effect of a new immunosuppressive agent, everolimus, on interleukin-10 gene-deficient mice with colitis. *Clin Exp Immunol.* [Internet] 2007;148:348–359. Available from.
- [104] Massey DCO, Bredin F, Parkes M. Use of sirolimus (rapamycin) to treat refractory Crohn's disease. *Gut.* [Internet] 2008;57:1294–1296. Available from: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2008.157297>
- [105] Dumortier J, Lapalus M-G, Guillaud O, et al. Everolimus for refractory Crohn's disease: a case report. *Inflamm Bowel Dis.* [Internet] 2008;14:874–877. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18275074>
- [106] El-Khider F, McDonald C. Links of autophagy dysfunction to inflammatory bowel disease onset. *Dig Dis.* [Internet] 2016;34:27–34. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/442921>
- [107] Shakeri A, Cicero AFG, Panahi Y, et al. Curcumin: A naturally occurring autophagy modulator. *J Cell Physiol.* [Internet] 2018. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30239005>
- [108] Wu S, Zhang Y, Lu R, et al. Intestinal epithelial vitamin D receptor deletion leads to defective autophagy in colitis. *Gut.* [Internet] 2015;64:1082–1094. Available from: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2014-307436>
- [109] Sakiyama T, Musch MW, Ropeleski MJ, et al. Glutamine increases autophagy under basal and stressed conditions in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* [Internet] 2009;136:924–932.e2. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650850802177X>
- [110] Yanai H, Salomon N, Lahat A. Complementary therapies in inflammatory bowel diseases. *Curr Gastroenterol Rep.* [Internet] 2016;18:62.
- [111] Li X, Feng K, Li J, et al. Curcumin inhibits apoptosis of chondrocytes through activation ERK1/2 signaling pathways induced autophagy. *Nutrients.* [Internet] 2017;9:414. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/9/4/414>
- [112] Guo S, Long M, Li X, et al. Curcumin activates autophagy and attenuates oxidative damage in EA.hy926 cells via the Akt/mTOR pathway. *Mol Med Rep.* [Internet] 2016;13:2187–2193. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26781771>
- [113] Lee YJ, Kim N-Y, Suh Y-A, et al. Involvement of ROS in curcumin-induced autophagic cell death. *Korean J Physiol Pharmacol.* [Internet] 2011;15:1. Available from: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4196/kjpp.2011.15.1.1>
- [114] Zhao J, Sun Y, Shi P, et al. Celastrol ameliorates experimental colitis in IL-10 deficient mice via the up-regulation of autophagy. *Int Immunopharmacol.* [Internet] 2015;26:221–228. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576915001356>
- [115] Nys K, Agostinis P, Vermeire S. Autophagy: a new target or an old strategy for the treatment of Crohn's disease? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* [Internet] 2013;10:395–401.
- [116] Shoji-Kawata S, Sumpter R, Leveno M, et al. Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature* [Internet]. 2013;494:201–206. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23364696>