



HAL
open science

Inflammation associée aux infections à *Clostridium difficile*: rôle des flagelles et régulation par les microARN

Hussein Kobeissy

► **To cite this version:**

Hussein Kobeissy. Inflammation associée aux infections à *Clostridium difficile*: rôle des flagelles et régulation par les microARN. Bactériologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT: 2018SACLS539 . tel-03081206

HAL Id: tel-03081206

<https://theses.hal.science/tel-03081206>

Submitted on 18 Dec 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.

NNT : 2018SACLS539

Inflammation associée aux infections à *Clostridium difficile* : rôle des flagelles et régulation par les microARN

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Microbiologie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 29 novembre 2018, par

Hussein Kobeissy

Composition du Jury :

Olga Soutourina

Professeur des Universités, HDR
Université Paris-Saclay (I2BC UMR 9198)

Présidente

Imad Kansau

Professeur des Universités, HDR
Université Paris-Saclay (EA4043)

Directeur de thèse

Olivier Dussurget

Professeur des Universités, HDR
Institut Pasteur de Paris (Unité de recherche Yersinia)

Rapporteur

Jean-François Landrier

Directeur de recherche, HDR
Aix-Marseille Université (UMR INSERM 1062 / INRA 1260)

Rapporteur

Cristel Archambaud

Chargée de recherche
INRA (MICALIS UMR1319)

Examineur

Anne-Judith Waligora-Dupriet

Maître de Conférences des Universités, HDR
Université Paris Descartes (EA 4065)

Examineur

Remerciements

Je remercie vivement les rapporteurs de cette thèse, Monsieur le Professeur Olivier Dussurget et Monsieur le Docteur Jean-François Landrier, pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce travail. J'associe à ces remerciements Madame le Professeur Olga Soutourina, Madame le Docteur Anne-Judith Waligora-Dupriet et Madame le Docteur Cristel Archambaud pour l'intérêt qu'elles ont porté à mon travail de thèse et pour avoir accepté de l'examiner.

Je tiens ensuite à exprimer ma gratitude à Madame le Professeur Anne Collignon de m'avoir accueilli initialement à l'EP4043 depuis mon master 1 et de m'avoir soutenu depuis mon arrivée en France. Je remercie également Madame le Professeur Claire Janoir de m'avoir accueilli chaleureusement au sein de son laboratoire dans le cadre d'un contrat doctoral et pour le soutien qu'elle nous apporte pour le projet.

Imad... Depuis mon arrivée au laboratoire, nous avons traversé des moments difficiles, et plus d'une fois j'ai pensé que nous ne verrions jamais le bout du tunnel. À chacun de ces moments, tu étais là pour me reconforter et m'aider à avancer. Je ne te remercierais jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu as été comme un père pour moi, un grand frère et un encadrant expérimenté et compétent. Tu étais toujours disponible, patient et bienveillant. Sans toi, nous n'aurions jamais été à ce point de réussite. Je voulais que tu saches à quel point ton soutien a été d'une grande aide pour moi. Alors du fond du cœur... merci pour ton soutien Monsieur le Professeur Imad Kansau !

C'est avec un immense plaisir que je remercie Madame le Docteur Cécile Denève-Larrazet et Monsieur le Docteur Jean-christophe Marvaud. Merci Cécile pour ta gentillesse, ton soutien dès mon arrivée au laboratoire, tes efforts pour me former en Master 2 et la patience avec laquelle tu répondais à toutes mes questions. Merci Jean-

Christophe pour ta disponibilité, ton aide précieuse et ta grande collaboration à ce travail. Les efforts que vous avez faits pour moi et pour le projet, le temps que vous m'avez donné et les conseils avisés... Nous n'aurions pas avancé aussi rapidement si vous n'aviez pas été là. Merci, merci et merci encore !

Une chose est sûre, je n'aurais rien pu faire sans vous, Imad, Cécile et Jean-Christophe ! Tout ce que vous avez fait signifie beaucoup pour moi ! Vous êtes les meilleurs !

Je voudrais exprimer ma gratitude à tous les membres du laboratoire, Alban Le Monnier, Bruno Kalama, Séverine Péchiné, Sylvie Boutier, Thomas Candela, Thierry Lambert, Nadège Bourgeois, Marie-Françoise Bernet-Camard, Sylvie Lambert, Sandra Hoys et Myriam Gaudrillet pour leur aide, leur bonne humeur et leur gentillesse.

Sans oublier l'ensemble des Jeunes Docteurs, Jameel, Anna, Jean-François, pour leur aide, leurs encouragements et leur soutien. Et bien sûr Kéloïse, ma camarade de route, nous avons eu des parcours parallèles dès le début du master, avec le dépôt des candidatures de thèse et les mêmes entretiens ! Et ce jusqu'à nos soutenances ce mois-ci... Je lui souhaite une excellente continuation.

Je garderai un très bon souvenir de vous tous.

Je souhaite remercier de tout cœur tous mes amis : le véritable ami et frère Nassar Nassar, le très vif Ahmad Jouni, le très drôle Moustapha Kaidar et le studieux Kassin Ghaddar... Cette étape de ma vie aurait été très difficile sans votre soutien moral, et tout ce qui me manquait à Paris c'était votre présence à mes côtés !

Je remercie infiniment Ali Nasrallah, Ahmad Abdallah et Mohamad Rammal dont la rencontre est l'une des meilleures choses qui me soient arrivées en France. Un grand merci aux amis que j'ai rencontrés à la faculté de pharmacie à Châtenay-Malabry :

Sophia, Diana, Almar, Hani et Afif. Vous avez été une très belle compagnie. Merci encore à Mohamad Ghassani et Koussein Nasrallah qui m'ont beaucoup soutenu à mon arrivée à Paris.

Merci aux deux premières personnes que j'ai rencontrées à mes premiers pas à la faculté de pharmacie, Samaher et Rawan, et également à leurs familles pour leur très belle et sincère amitié.

Un très grand merci à Monique Geesen, c'était un grand plaisir de te connaître et t'avoir à mes côtés durant tout mon parcours. Merci pour ta gentillesse, ton soutien, ta confiance et tes pommes.

Un grand merci du fond du cœur à une personne qui compte énormément pour moi, qui m'a soutenu, écouté et encouragé. Je n'oublierais jamais que ton apparition dans ma vie l'a merveilleusement changée. Merci d'avoir rendu ma thèse plus supportable et d'être là malgré la distance, distance qui devrait bientôt s'effacer.

Je n'aurais pas la capacité de trouver des mots à la hauteur de ce que ma famille m'a offert. Mon frère Rabih, tu ne peux pas imaginer à quel point tes visites à Paris m'étaient précieuses, merci pour tout ce que tu as fait ! Merci à mes deux sœurs Rayan et Nour, la joie de mon cœur, vous êtes sans doute le meilleur cadeau de ma vie ! Mon père, merci pour la tendresse, ton soutien qui m'a été indispensable, merci d'avoir été là à tout moment ! Le plus grand merci revient à ma mère, la personne qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci maman pour chaque larme de tes yeux, merci maman pour chaque conseil, chaque câlin et chaque rêve partagé, ce travail n'est qu'un petit cadeau que je t'offre, merci mille fois Maman !

Enfin, je remercie du fond du cœur Celui qui est la raison de ma réussite dans ce travail et la source de tout le bien dans ma vie.

Table des matières

Liste des abréviations.....	1
Préambule	7
Revue Bibliographique.....	11
I. Les infections à <i>Clostridium difficile</i> (ICD).....	11
I.1. Historique.....	11
I.2. Epidémiologie des infections à <i>C. difficile</i>	13
I.2.1. Données actuelles sur l'épidémiologie des ICD.....	13
I.2.2. Mortalité associée aux ICD.....	15
I.2.3. L'impact économique des ICD	16
I.2.4. Distribution des ribotypes de <i>C. difficile</i> en Europe	18
I.2.4.1. Particularités des souches épidémiques PCR-ribotype-027	20
I.3. Facteurs de risques d'ICD.....	21
I.4. Manifestations cliniques des ICD	23
I.4.1. Portage asymptomatique.....	24
I.4.2. Diarrhées à <i>C. difficile</i>	24
I.4.3. Colites à <i>C. difficile</i>	24
I.4.4. Complications	25
I.4.5. Récidives.....	25
I.4.6. Autres infections à <i>C. difficile</i>	26
I.5. Diagnostic des ICD	26
I.6. Traitement des ICD.....	30
I.6.1. Traitement antibiotique.....	30
I.6.1.1. Résistance de <i>C. difficile</i> aux antibiotiques	33
I.6.2. Traitements non antibiotique des ICD	34
I.6.3. La place des immunomodulateurs dans le traitement des ICD.....	36
II. Pathogénicité de <i>Clostridium difficile</i>	38
II.1. La sporulation de <i>C. difficile</i>	40
II.1.1. Composition de la spore	40
II.1.2. Formation de la spore	41
II.1.3. Germination de la spore.....	43
II.1.3.1. Induction de la germination	43
II.1.3.2. Dégradation du cortex de la spore.....	45
II.2. Colonisation du côlon par <i>C. difficile</i>	45

II.2.1.	Résistance aux défenses innées de l'hôte.....	46
II.2.2.	Facteurs de colonisation	46
II.2.2.1.	Adhésines	46
II.2.2.2.	Protéines de liaison à la matrice extracellulaire	50
II.2.2.3.	Protéine de choc thermique GroEL.....	51
II.2.2.4.	Les flagelles.....	51
II.3.	Les toxines.....	57
II.3.1.	Les toxines TcdA et TcdB	57
II.3.1.1.	Régulation de l'expression.....	57
II.3.1.2.	Structure et mécanisme d'action de TcdA et TcdB	59
II.3.1.3.	Toxicité de TcdA et TcdB.....	62
II.3.2.	La toxine binaire CDT	63
II.3.2.1.	Régulation de l'expression.....	63
II.3.2.2.	Mécanisme d'action de CDT	64
II.3.2.3.	Toxicité de CDT	64
III.	L'interaction hôte - <i>C. difficile</i>	65
III.1.	Les <i>Toll-like receptors</i> (TLR).....	65
III.1.1.	Voies de signalisation associées aux TLRs.....	68
III.1.1.1.	Voie de signalisation dépendante de MyD88.....	68
III.1.1.2.	Voie de signalisation indépendante de MyD88	71
III.2.	La réponse innée contre <i>C. difficile</i>	72
III.2.1.	Réponse aux toxines TcdA et TcdB	72
III.2.2.	Réponse aux protéines de la couche S.....	74
III.2.3.	Réponse aux flagelles.....	74
III.3.	La réponse immunitaire adaptative contre <i>C. difficile</i>	76
IV.	Les microARN	78
IV.1.	Généralités.....	78
IV.2.	Biogenèse des miARN	80
IV.2.1.	Transcription des gènes codant les miARN	80
IV.2.2.	Maturation et clivage des pri-miARN en pré-miARN par Drosha et DGCR8	81
IV.2.3.	Exportation du pré-miARN dans le cytoplasme par l'exportine 5	83
IV.2.4.	Clivage et maturation du pré-miARN.....	83
IV.2.5.	Le complexe miRISC.....	84
IV.3.	Mécanismes d'action des miARN	86

IV.3.1.	Appariement à l'ARNm cible	86
IV.3.2.	Régulation de l'expression de la cible.....	88
IV.3.2.1.	Inhibition de la traduction des ARNm	89
IV.3.2.1.1.	Inhibition de l'initiation de la traduction	89
IV.3.2.1.2.	Inhibition post-initiation de la traduction.....	90
IV.3.2.2.	Désadénylation et dégradation des ARNm.....	92
IV.3.2.3.	Séquestration des ARNm dans les corps P	93
IV.4.	Les microARN extracellulaires.....	94
IV.5.	Fonctions biologiques et physiopathologiques des microARN	97
IV.6.	MiARN et infections bactériennes.....	100
IV.7.	MiARN et infections virales.....	104
IV.8.	MiARN et réponse immunitaire	106
IV.8.1.	MiARN et inflammation	108
IV.8.2.	MiARN et voies de signalisation des récepteurs TLRs.....	110
IV.9.	MicroARN et thérapeutique.....	114
	Travaux personnels.....	123
I.	Objectifs scientifiques	123
II.	Publication 1	127
III.	Publication 2	157
	Discussion générale	195
	Conclusion et perspectives.....	207
	Références bibliographiques.....	211

Liste des abréviations

AGO : Argonaute
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
AMPc : *Cyclic Adenosine Monophosphate*
AP-1 : *Activator Protein 1*
APD : *Autoprotease Domain*
ARNdb : ARN double brin
ASC : *Apoptosis-associated Speck-like protein Containing a CARD*
ASO : *Antisens Oligonucleotide*
Bach1 : *BTB and CNC homology 1*
BIC : *B-cell integration cluster*
BMDC : *Bone-Marrow-Derived Dendritic Cells*
CAMP : *Cationic Anti-Microbial Peptide*
CARD : *Caspase Activation and Recruitment Domain*
CBP/p300 : *cAMP responsive element binding protein*
CbpA : *Collagen binding protein A*
CCL3 : *Chemokine (C-C motif) ligand 3*
CCNA : *Cell Cytotoxicity Neutralisation Assay*
Cdc42 : *Cell division control protein 42*
CDT : *Clostridium difficile Toxin*
CMH II : *Complexe Majeur d'histocompatibilité de classe II*
COX-2 : *Cyclo-Oxygénase-2*
CPM : *Colites PseudoMembraneuses*
CROPS : *C-terminally combined Repetitive OligoPeptides*
CSPG4 : *Chondroïtin sulfate proteoglycan 4*
CWP : *Cell Wall Proteins*
CXCL2 : *Chemoattractant chemokine (C-X-C motif) ligand 2*
DAMP : *Damage-Associated Molecular Patterns*
DC : *Dendritic Cells*
DGCR8 : *DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8*
die-1 : *dorsal intercalation and elongation defect-1*
dsRBD : *double-stranded RNA binding domain*
ECDC I : *European Center for Disease Prevention and Control*
EIA : *enzyme immunoassay*
eIF4E : *eukaryotic translation initiation factor (eIF) 4E*
ESCMID : *European Society of Clinical Microbiology and infectious Diseases*
FADD : *Fas-associated death domain protein*
FbpA : *Fibronectin binding protein A*
GCY-5 : *Guanylyl Cyclase-5*
GDH : *Glutamate Déshydrogénase*
GlcNAc : *N-Acetylglucosamine*
GRO : *Growth-Related Oncogen*
GTD : *Glycosyltransferase amino-terminal Domain*
GW182 : *glycine-tryptophan protein 182 kDa*

H2RA : *Histamine-2 Receptor Antagonist*
HAP : *Hook-Associated Protein*
HDL : *High-Density Lipoprotein*
HMB1 : *HighMobility Group Box 1*
HMW-SLP : *High-Molecular Weight-Surface Layer Protein*
HO-1 : *Haemoxygenase-1*
Hsp60 : *Heat shock protein 60*
ICAM-1 : *Intracellular Adhesion Molecule 1*
ICD : *Infection à C. difficile*
IFN-I : *Interférons de type I*
Ig : *Immunoglobuline*
IKK : *Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*
IL-8 : *Interleukine-8*
iNOS : *inducible Nitric Oxyde Synthase*
InsP6 : *Inositol hexaphosphate*
InVS : *Institut de Veille Sanitaire*
IPC : *International Patent Classification*
IPP : *Inhibiteurs de la Pompe à Protons*
JAK1 : *Janus Kinase 1*
JNK : *c-Jun N-terminal kinases*
LCI : *Cellules lymphoïdes innées*
let-7 : *Lethal-7*
lin-4 : *abnormal cell lineage-4*
IRF3 : *Interferon Regulatory Factor 3*
LMW-SLP : *Low-Molecular Weight-Surface Layer Protein*
LPS : *Lipopolysaccharide*
LSR : *Lipolysis-Stimulated lipoprotein Receptor*
lssy-6 : *Laterally symmetric-6*
m7G : *7-methylguanosine*
MAMPS : *Microbe Associated Molecular Patterns*
MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*
MAP2K : *MAPK kinase*
MAP3K : *MAPKK kinase*
MCP-1 : *CC chemokine monocyte chemo-attractant protein 1*
M-CSF : *Macrophage Colony-Stimulating Factor*
MDCD : *Monocytes dérivés des cellules dendritiques*
MDR : *Multi Drug Resistance*
MICI : *Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin*
MIP-2 : *Macrophage-inflammatory protein-2*
MIP-3a : *Macrophage Inflammatory Protein-3a*
miRISC : *miARN-induced silencing complex*
MKK3 : *Mitogen-activated protein Kinase Kinase 3*
MurNAc : *N-Acetylmuramic acid*
MyD88 : *Myeloid differentiation primary response 88*
NAAT : *Nucleic Acid Amplification Test*

NAP1 : *NF- κ B Activating kinase Associated Protein 1*
NAP1 : *North American Pulsotype 1*
NEMO : *NF-kappa-B Essential Modulator*
NF- κ B : *Nuclear Factor kappa B*
NK : *Natural killer*
NLRPs : *Nucleotide-binding domain leucin-rich repeat containing proteins*
NOD : *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like receptors*
NPM : *Nucleophosmin 1*
PABP : *poly-A binding protein*
PABPC : *poly(A)-binding protein, cytoplasmic*
PACT : *Interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein kinase activator A*
PAMP : *Pathogen Associated Molecular Patterns*
PAZ : *Piwi-Argonaute-Zwille*
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
PDCD4 : *Programmed cell death 4*
PDK1 : *3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*
PFGE : *Pulse Field Gel Electrophoresis*
PGC : *Primordial Germinal Cells*
PGE2 : *Prostaglandine E2*
PIK3R2 : *Phosphoinositol-3 kinase Regulatory subunit 2*
PIWI : *P-element induced wimpy testis*
PKI α : *Protein Kinase cAMP-dependent, catalytic inhibitor alpha*
PRR : *Pattern Recognition Receptors*
PVRL3 : *PolioVirus receptor 3*
RAISIN : *Réseau d'alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales*
REA : *Restriction Endonuclease Analysis*
REST : *RE1-silencing transcription factor*
RHD : *Rel Homology Domain*
RIP1 : *Receptor Interacting Protein 1*
RNAi : *RNA interference*
ROS : *Reactive Oxygen Species*
RT : *Ribotype*
SCP1 : *Small C-terminal domain Phosphatase-1*
SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*
SHEA/IDSA : *Society for Healthcare Epidemiology of America/The infectious Diseases Society of America*
SHIP1 : *SH2- containing inositol 5'-phosphatase 1*
SLP : *S-layer proteins*
SMAD2 : *Sma- and Mad-related protein 2*
Spred-1 : *Sprouty-related protein 1*
SPRY1 : *Sprouty Homologue 1*
SR-BI : *Scavenger receptor class B type I*
STAT1 : *Signal Transducer and Activator of Transcription 1*
TAB1 : *TAK1 Binding protein 1*
TAK1 : *Transforming growth factor- β -Activated Kinase 1*

TBK1 : *Tank Binding Kinase 1*
TC : *Toxigenic Culture*
TIRAP : *TIR domain containing adaptor protein*
TLR : *Toll-like receptor*
TMF : *Transplantation de Microbiote Fécal*
TNF : *Tumor Necrosis Factor*
TNRC6A-C : *Trinucleotide Repeat-Containing 6A, B and C*
TP53INP1 : *Tumor protein p53-inducible nuclear protein 1*
TRAF6 : *TNF-receptor associated-factor 6*
TRAM : *TRIF-related adaptor molecule*
TRBP : *TAR RNA-binding protein*
TRIF : *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*
Tspan14 : *Tétraspamine 14*
TTP : *Tristétraproline*
Ubc13 : *E2 ubiquitin conjugating enzyme 13*
Uev1A : *Ubiquitin conjugating enzyme E2 variant 1 isoform A*
UFC : *Unité formant des colonies*
VCAM-1 : *Vascular Cellular Adhesion Molecule 1*
VHC : *Virus de l'Hépatite C*
VM : *Vésicules Membranaires*
VSV : *Vesicular Stomatitis Virus*
XPO5 : *Exportine 5*

CONFIDENTIEL

Préambule

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

Préambule

Clostridium difficile est la principale bactérie entéropathogène responsable d'infections nosocomiales associées aux antibiotiques dans les pays industrialisés. L'exposition aux antibiotiques, l'hospitalisation et l'âge avancé sont les principaux facteurs de risque associés à l'infection à *C. difficile* (ICD). L'ICD peut aller d'une diarrhée légère à une colite pseudomembraneuse grave menaçant le pronostic vital. L'augmentation de l'incidence et de la sévérité des ICDs ces dernières années coïncide avec l'émergence de clones épidémiques, en particulier des souches de ribotype 027. Cette augmentation a été accompagnée d'une augmentation des coûts des soins. Aux États-Unis, l'impact économique annuel des ICDs sur le système de santé est estimé à près de 4,8 milliards de dollars en coûts supplémentaires dans les établissements de soins aigus. La plupart de ces coûts a été attribuée à des épisodes primaires d'ICD, avec un coût de 12 607 dollars par cas. En Europe, les coûts de prise en charge des ICD estimés par le Centre européen de prévention et contrôle des maladies (CEPCM) atteignent près de 4,4 milliards d'euros par an. Ces coûts élevés sont en grande partie liés à la prolongation des durées de séjours hospitaliers et la nécessité d'isolement des patients. Les toxines cytolytiques TcdA et TcdB de *C. difficile* représentent les facteurs majeurs de virulence et contribuent directement à la pathologie associée aux ICDs. D'autres facteurs jouent également un rôle dans la colonisation et la pathogénicité de la bactérie dont les adhésines (notamment les protéines de la couche S), les protéines de liaison à la matrice extracellulaire, les protéines de choc thermique, des protéases et les flagelles. Les flagelles bactériens confèrent la mobilité et le chimiotactisme à la bactérie et jouent également un rôle dans sa virulence en contribuant à plusieurs processus infectieux dont l'adhésion aux cellules de l'hôte, l'invasion cellulaire, l'auto-agglutination et la formation de biofilms. Les flagelles de *C. difficile* sont impliqués dans l'induction d'une réponse inflammatoire intestinale. En effet, la flagelline (FliC), composant structurel du filament des flagelles bactériens, interagit avec le récepteur de l'immunité innée TLR5 (*Toll-like-receptor 5*) et induit l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires des MAPKs et de NF- κ B. Notre équipe a récemment rapporté que la souche épidémique (ribotype 027) R20291 de *C. difficile*, via l'interaction FliC-TLR5, active les voies de signalisation des MAPKs ERK1/2, JNK et p38, ainsi que celle de NF- κ B, dans un modèle de cellules épithéliales intestinales Caco-2, et induit la production de cytokines pro-inflammatoires. Par ailleurs, nous avons montré, à l'aide d'inhibiteurs des voies de signalisation, que la voie de NF- κ B est la voie du TLR5 principalement activée par la flagelline pour la production d'IL-8.

Dans la première partie des travaux de recherche de cette thèse, nous avons confirmé *in vivo*, dans un modèle murin d'infection à *C. difficile*, le rôle de la flagelline de *C. difficile* dans la réponse inflammatoire intestinale et l'induction des voies de signalisation pro-inflammatoires associées. Nous

avons démontré que les flagelles agissent en synergie avec les toxines dans l'induction de cette réponse inflammatoire. Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes de régulation de cette réponse inflammatoire intestinale. Différents mécanismes de régulation des voies de signalisation des TLR ont été décrits. Parmi ces mécanismes, les microARN, des courtes séquences d'ARN non codant endogènes de 21 à 24 nucléotides, responsables de la régulation post-transcriptionnelle de gènes par leur action spécifique sur les ARNm, jouent un rôle d'immunomodulateurs de la réponse innée par la régulation des voies dépendantes des TLRs. Les miARN, dont l'expression pourrait être induite par l'activation des TLRs, modulent la réponse inflammatoire par l'inhibition d'effecteurs des cascades de signalisation. Ces dernières années, de nombreuses recherches ont été initiées pour développer une nouvelle thérapie basée sur les miARNs selon deux stratégies distinctes : l'inhibition de leur activité, en utilisant des antagonistes des miARN (anti-miR), et l'augmentation de leur activité en utilisant des molécules mimants les miARN (*miR-mimic*). Cette activité régulatrice fait de ces molécules des candidats médicament potentiels de nouvelle génération. Par conséquent, la modulation de la réponse inflammatoire en utilisant des *miR-mimics* ou des anti-miRs pourrait contribuer à réduire la réponse délétère de l'hôte, induite par les ICD, et responsable d'importantes lésions tissulaires et des manifestations cliniques sévères.

Afin de comprendre le mécanisme de régulation de la réponse inflammatoire induite par *C. difficile* par les miARN, nous avons étudié l'expression et le rôle des miARN *in vitro* dans un modèle de cellules épithéliales intestinales et *in vivo* dans un modèle murin de l'infection. L'ensemble de nos résultats suggère que l'activation de la voie de signalisation pro-inflammatoire NF- κ B induite par les flagelles de *C. difficile* provoque une surexpression d'un miARN nommé miR-27a-5p qui à son tour inhibe, via une boucle de rétrocontrôle négatif, la voie de signalisation NF- κ B. Les conséquences d'une telle régulation pourraient avoir une incidence dans le degré de la réponse inflammatoire et donc dans des manifestations cliniques observées durant l'ICD. Cet aspect de la régulation de la réponse inflammatoire pourrait apporter des éléments nouveaux à considérer dans le contrôle des formes graves de l'infection par *C. difficile*. Nos résultats apportent la preuve de concept du rôle important du miR-27a-5p dans la modulation de la réponse inflammatoire et de son effet anti-inflammatoire au cours de l'ICD, et font actuellement l'objet d'une demande de brevet.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous présenterons une revue bibliographique consacrée à l'infection à *C. difficile*, à la pathogénicité de la bactérie et à ses interactions avec son hôte. Une deuxième partie présentera les microARN, leur biogenèse, leur mécanisme d'action et leurs différentes fonctions biologiques. Nous développerons ensuite nos travaux expérimentaux sous forme d'un article publié et d'un second préparé pour soumission en attente du dépôt d'un brevet. Une discussion générale terminera ce manuscrit.

**REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE**

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

Revue Bibliographique

I. Les infections à *Clostridium difficile* (ICD)

I.1. Historique

C. difficile a été décrit pour la première fois par Hall et O'Toole en 1935, lors d'une étude sur la modification de la composition microbienne journalière des selles des nouveau-nés après leur hospitalisation. La bactérie a été décrite comme un bacille à Gram positif anaérobie strict avec des spores allongées et non bombées (Figure 1). A cause des difficultés rencontrées pour son isolement et sa culture *in vitro*, elle a été alors nommée « *Bacillus difficilis* » (1,2). Une autre propriété remarquable était sa pathogénicité. Certaines souches étaient capables de produire des toxines qui, injectées dans les tissus, provoquaient une mort par arrêt respiratoire avec des œdèmes dans les tissus sous-cutanés des lapins, chats, chiens, rats, pigeons et des cobayes (3). Cette bactérie sera classée, en 1938, dans le genre *Clostridium* et sera nommée *Clostridium difficile* dans l'« Approved List of Bacterial Names » (4). Entre 1940 et 1970, *C. difficile* a été toujours considérée comme commensale de l'Homme, malgré plusieurs études qui ont rapporté l'isolement de la bactérie chez des patients hospitalisés mais sans qu'un rôle pathogène ne lui soit attribué (5,6).

Les colites pseudomembraneuses (CPMs) ont été décrites pour la première fois en 1893, avant la disponibilité des antibiotiques, comme une complication post-opératoire d'un ulcère peptique obstructif chez une jeune femme (7). Dix jours après la chirurgie, la patiente développe une diarrhée hémorragique et meurt (8). Après l'autopsie, la maladie a été identifiée comme une colite diphtérique. L'association des CPMs avec *C. difficile* ne sera décrite qu'après 1977, lorsque plusieurs études publiées pendant la même période ont rapporté le rôle de *C. difficile* dans l'apparition des CPMs. La première étude a montré la présence d'une grande quantité de toxines dans les selles des patients atteints de CPMs, suggérant ainsi que la bactérie, présente en faible quantité dans l'intestin des sujets sains, était capable, dans certaines conditions, de se multiplier et de produire des toxines qui allaient à leur tour induire des diarrhées post-opératoires ou des CPMs (9). En avril 1978, une deuxième étude a rapporté l'isolement de *C. difficile* dans des selles de patients atteints de CPMs, associées au traitement à la clindamycine, la présence des toxines dans les selles, mais également la toxicité de l'isolat sur une culture *in-vitro* (10). Une troisième étude, publiée en mai 1978, a montré que *C. difficile* était responsable des CPMs et que le traitement par des antibiotiques pourrait modifier le microbiote intestinal et induire par la suite une susceptibilité

à l'infection (Figure 1) (11). Vers la fin de l'année 1978, il a été démontré que la vancomycine élimine *C. difficile* du colon, une élimination associée au rétablissement rapide des patients atteints de CPMs (12). Depuis, le nombre d'études qui rapportent les cas d'infection à *C. difficile* (ICD) dans les hôpitaux a fortement augmenté et *C. difficile* est devenu un pathogène des années 90 (13).

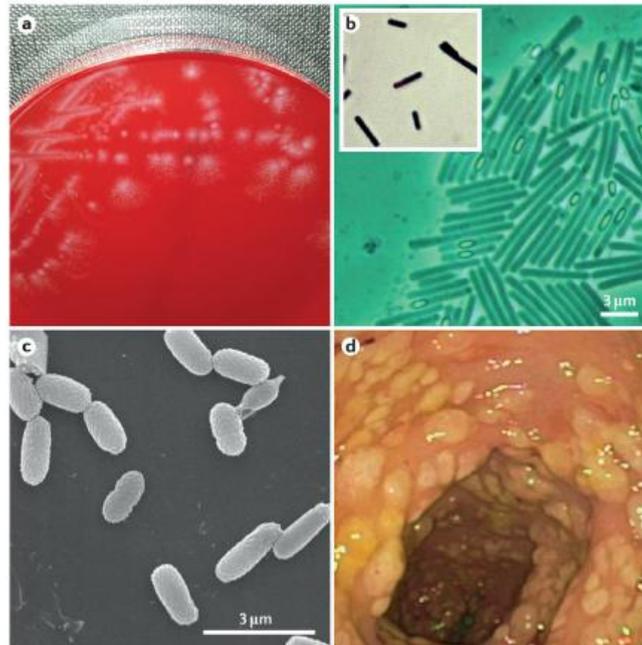


Figure 1. *Clostridium difficile*. a. Image typique des colonies de *Clostridium difficile* sur gélose au sang. b. Image en microscopie à contraste de phase d'une culture de *C. difficile* avec des cellules végétatives (bâtonnets allongés), des spores en formation (taches foncées subterminales) et des spores brillantes (ellipsoïdes brillants). c. Micrographie électronique à balayage des spores de *C. difficile*. d. Image endoscopique de la colite pseudomembraneuse causée par *C. difficile*. Les tissus sains du colon sont roses, les pseudomembranes résultant d'une infection à *C. difficile* sont jaunes (2).

Au début des années 2000, une forte augmentation de l'incidence, de la sévérité et de la mortalité associées aux ICD a été rapportée en Europe et en Amérique du Nord. Cette augmentation est liée à l'émergence de nouvelles souches et principalement les souches dites « hypervirulentes » et « épidémiques », nommées « 027 » en référence à leur profil par PCR-ribotypage, ou « NAP1 » selon leur profil en électrophorèse en champ pulsé (14). *C. difficile* représente actuellement un problème de santé publique mondiale et est considéré comme la première cause d'infections nosocomiales associées aux antibiotiques (15 à 25 % des cas de diarrhées associées aux antibiotiques et plus de 95 % des cas de CPM) (Figure 2) (15–17).

Durant ces dernières années, il a été démontré grâce aux technologies de séquençage de nouvelle génération que *C. difficile* présente des caractéristiques très proches de la famille des

Peptostreptococcaceae, suggérant ainsi que *C. difficile* devrait être classé dans un nouveau genre de *Peptoclostridium* tout en modifiant son nom en *Peptoclostridium difficile*. Ce nouveau genre proposé regroupe les bactéries à Gram-positives, mobiles, anaérobies strictes et sporulées (souches mésophiles ou thermophiles, pH neutre ou alcalin, oxydase-catalase négative et avec une proportion entre 25 et 32 % en GC de l'ADN génomique) (18). Très récemment, une nouvelle classification a été proposée. En se basant sur des analyses phénotypiques, chimiotaxonomiques et phylogénétiques, le nouveau genre *Clostridioides* est proposé pour *Clostridium difficile*, modifiant ainsi son nom en *Clostridioides difficile* ; il a également été proposé de transférer l'espèce *Clostridium mangenotii* dans ce genre, sous le nom de *Clostridioides mangenotii* (19).

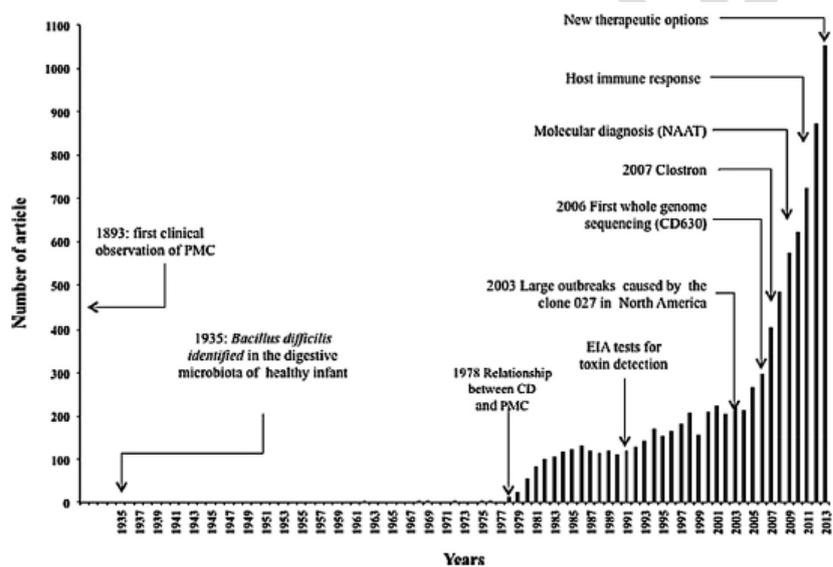


Figure 2. Caractère exponentiel de la littérature et principales dates de l'histoire de *Clostridium difficile* attestant de l'intérêt renouvelé pour la bactérie. La réémergence des infections liées à *C. difficile* a stimulé la recherche clinique et fondamentale sur la bactérie, comme le prouve le nombre d'articles sur *C. difficile* référencés dans PubMed, multipliés par 3 entre 2000 et 2013. EAI : enzyme immunoassay ; NAAT : nucleic acid amplification test ; PMC: pseudomembranous colitis (17).

I.2. Epidémiologie des infections à *C. difficile*

I.2.1. Données actuelles sur l'épidémiologie des ICD

C. difficile est considéré comme un problème de santé publique majeur, se traduisant par des répercussions économiques importantes dans le monde. L'incidence des ICD, ainsi que le nombre de cas, varient considérablement d'un pays à un autre. Durant la dernière décennie, de véritables épidémies se sont développées, notamment en Amérique du Nord et en Europe, avec l'apparition des souches dites hypervirulentes ou épidémiques 027. Ces souches représentent un groupe

distinct parmi quatre groupes génétiquement différents de *C. difficile* et sont à l'origine de l'augmentation de l'incidence et de la mortalité associée aux ICD dans les pays développés (20).

L'émergence des ICD, accompagnée d'une augmentation de la population vulnérable, en particulier dans les établissements de santé, a provoqué une augmentation de la fréquence des complications médicales et chirurgicales, des coûts de prise en charge des patients et de la mortalité associée aux ICD. Aux États-Unis, entre 1996 et 2000, le nombre de cas annuel d'ICD était stable, entre 71 000 et 94 000, mais cette incidence a doublé en 2003 pour atteindre des chiffres allant de 151 000 à 205 000 cas d'ICD (21). Cette incidence a été ensuite estimée en 2015 entre 397 000 et 508 500 cas d'ICD avec une mortalité de 29 300 cas, ce qui montre une progression continue de l'incidence de l'infection au cours du temps (22). De plus, dans une étude des cas d'infections nosocomiales dans 183 hôpitaux de dix états américains, *C. difficile* a été le pathogène le plus rapporté comme étant responsable de 12,1 % d'infections nosocomiales et de 70,9 % d'infections nosocomiales gastro-intestinales (23). Une tendance similaire a été observée au Canada (24), où il a été montré que le ratio des ICD a doublé entre les années 1991 et 2003, de 65,5 à 156,3 pour 100 000 habitants respectivement (25). En outre, la proportion de patients ayant développé des complications a augmenté de 7,1 % à 18,2 %, et la mortalité associée a également augmenté de 4,7 % à 13,8 % durant la même période (25).

Plusieurs études multicentriques ont été menées pour décrire l'épidémiologie des ICD et estimer leur prévalence et leur incidence en Europe. En 2000, l'incidence des ICD a été estimée à 1,1 cas par 10 000 patients-jour (26). En 2005, cette incidence a doublé à 2,5 cas par 10 000 patient-jours et elle a atteint 4,1 cas par 10 000 patient-jours en 2008 (27,28). En 2011-13, une étude prospective, multicentrique et biannuelle des ICD chez des patients hospitalisés présentant une diarrhée (EUCLID) a estimé une incidence d'ICD de 7 cas par 10 000 patient-jours (29). Ainsi, le centre européen pour la prévention et le contrôle des maladies (ECDC) a mené une étude des infections nosocomiales dans les centres hospitaliers européens sur plus de 230 000 patients dans 33 pays Européens. La prévalence des ICD a été estimée à 3,7 % alors que le nombre de cas d'ICD a été estimé à une moyenne de 123 997 cas par an (entre 61 018 et 284 857) avec une mortalité attribuable de 3 % (3 700 décès attribuables par an) (30).

En France, les ICD ont été classées en tête de liste des infections nosocomiales déclarées en 2006 (31). Auparavant, *C. difficile* n'avait été isolé que de manière ponctuelle dans quelques hôpitaux, sans être responsable d'épidémies. En mars 2006, l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) recevait le signalement de cas groupés d'ICD dans un établissement de santé du Nord de la France. Cet épisode a concerné 33 cas d'infections entre janvier et mai 2006 (32). Au total, d'après l'InVS, de

janvier 2006 à mars 2007, 41 établissements de santé ont signalé 515 cas d'ICD dans le Nord-Pas-de-Calais. Cette épidémie a été expliquée principalement par l'émergence des souches 027. Il s'agissait alors de la première épidémie d'ICD par la souche 027 détectée en France (33). En 2009, une étude basée sur le signalement au réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN) a été menée sur les formes sévères d'ICD dans 105 hôpitaux de court séjour et 95 de moyen et long séjour. L'incidence des ICD était respectivement de 2,28 pour 10 000 patients-jour, dont 14 % de formes sévères, et de 1,15 pour 10 000 patients-jour, dont 2 % de formes sévères (34).

L'incidence des ICD reste pourtant sous-estimée en Europe, non seulement à cause de l'émergence des souches épidémiques, mais également par l'absence de diagnostic microbiologique des ICDs. Ainsi, il est nécessaire de sensibiliser les médecins et les professionnels de santé au diagnostic et à la détection des ICD par la mise en place d'algorithmes de diagnostic proposées pour pallier la sous-estimation de ces infections (Voir Chapitre 1.5. Diagnostic des ICD) (29).

Comme expliqué ci-dessus, l'épidémiologie des ICD a changé au cours de la dernière décennie, mais le changement le plus remarquable est l'incidence accrue des ICD communautaires, dans des populations considérées historiquement comme étant à faible risque, dont les femmes en péripartum non pathologique, les enfants, les patients sans antibiothérapies et ceux non hospitalisés (35,36). Les données des États-Unis et de l'Europe suggèrent que 20 à 27 % de tous les cas d'ICD ont lieu en communauté (37). Une étude publiée en 2012, menée dans le Minnesota aux États-Unis, a montré que 41 % des cas d'ICD sont communautaires, et que leur incidence des ICD a augmenté de 5,3 fois entre 1991 et 2005 (38). Ces données démontrent qu'une proportion importante des cas d'ICD se développe en dehors du milieu hospitalier et elle implique en général des patients plus jeunes et moins malades. L'impact des ICD est donc sous-estimé car il est évalué, dans la plupart des études, sur les cas d'ICD dans le milieu hospitalier, sans prendre en compte l'incidence de ces infections communautaires.

I.2.2. Mortalité associée aux ICD

Au cours de ces dernières années, il a été rapporté non seulement une augmentation de l'incidence, mais également de la sévérité des ICD avec une augmentation des complications et de la mortalité (25,39–41). Ainsi, durant des épisodes d'ICD, la mortalité toutes causes confondues a été estimée entre 15 et 25 % dans le mois suivant l'infection (42–45). Aux États-Unis, le nombre de cas de mortalité où l'ICD était la cause principale a augmenté de plus de 9 fois entre 1999 et 2008, de 793 à 7483 cas respectivement (46). En 2009, les données d'une étude américaine ont observé une mortalité de 9,1 % des patients hospitalisés atteints d'ICD, comparée à moins de 2 % de

mortalité par autres causes chez des patients hospitalisés (47). Une étude canadienne a également rapporté une augmentation de 4 fois de la mortalité attribuable aux ICD entre 1997 et 2005 (1,5 % vs 5,7 %), avec une prédominance pour les patients âgés de plus de 65 ans (44). Une étude Pan-Européenne menée en 2008 dans 106 laboratoires de 34 pays Européens (avec une contribution de 1 à 6 hôpitaux par pays, relativement à la taille de la population), a rapporté que 22 % des patients décèdent dans les trois mois suivant l'ICD (toutes causes confondues), 2 % des patients décédant directement de leur infection, alors que l'ICD représente une cause contributive dans 7 % des cas (27). En France, l'ICD est considérée comme une cause attribuable dans 1 % des cas et une cause contributive dans 4 % des cas qui décèdent dans le mois de l'infection (34).

Cette morbi-mortalité associée aux ICD est très probablement liée à la sévérité de l'inflammation intestinale, notamment chez les patients âgés ou les patients présentant d'autres comorbidités (cancer, diabète...). Par exemple, dans une étude prospective sur un groupe de 120 patients hospitalisés infectés par *C. difficile*, la persistance de la diarrhée et la sévérité de l'infection ont été corrélées à des marqueurs fécaux de l'inflammation intestinale (ARNm fécal de l'interleukine-8 (IL-8) et de CXCL-5 et protéine IL-8 fécale) mais pas à la charge bactérienne fécale, qui a diminué après le traitement par le métronidazole ou la vancomycine. Les auteurs suggèrent ainsi que la modulation de la réponse de l'hôte, en plus de la diminution de la charge bactérienne, pourrait constituer une approche plus efficace pour traiter les patients avec une maladie persistante (48).

1.2.3. L'impact économique des ICD

Malgré le progrès des outils diagnostiques et thérapeutiques pour la prise en charge des ICD et des efforts de prévention pour réduire leur incidence, l'infection reste un vrai défi pour les systèmes de santé à l'échelle mondiale. D'un point de vue économique, l'ICD augmente le coût de la prise en charge des patients, principalement du fait de l'allongement de la durée d'hospitalisation, mais également du fait de l'augmentation des réadmissions et de la consommation en analyses de laboratoire et en médicaments (49). Aux Etats-Unis, les coûts directs des ICD ont été estimés à 4,8 milliards de dollars en 2008, avec un coût moyen de 24 400 dollars par cas, alors que le coût cumulé de tous les cas d'hospitalisation d'ICD a été estimé à 8,2 milliards de dollars (1,1 vs 7,1 milliards de dollars pour l'ICD comme diagnostic principal ou secondaire, respectivement) (47,50). La durée d'hospitalisation lorsque l'ICD est le diagnostic principal est de 7 jours, alors qu'elle augmente à 16 jours lorsque l'ICD est détectée en diagnostic secondaire avec un surcoût supérieur de 3 fois (47). En Europe, les coûts d'ICD sont estimés, en général, entre 5 798 et 11 202 euros par cas, mais les données ne sont disponibles qu'à partir de six pays Européens (Irlande, Angleterre, Allemagne, Espagne, France et Italie) (51). En Irlande, une étude récente a montré que le coût total

des ICD dans un hôpital était de 75 680 euros avec 5 820 euros par cas en moyenne (52). En Angleterre, les coûts d'ICD ont été estimés entre 5 000 et 15 000 euros par cas (53). En France, une étude multicentrique menée en 2011 sur 12 grands hôpitaux publics a révélé que les ICD représentent 5,82 % du nombre annuel cumulatif de patients-jour admis (54). L'incidence annuelle des ICD a été estimée selon cette étude à 3,74 cas pour 10 000 patients-jour. Dans le cas où l'ICD était le diagnostic principal, le coût d'ICD est estimé à 6 056 euros par cas en moyenne (médiane de 4 410 euros). Le coût cumulatif de l'ensemble des hospitalisations dans les 12 hôpitaux était de 823 656 euros. Lorsque l'ICD était identifiée comme diagnostic secondaire, le surcoût a atteint 11 251 euros par cas en moyenne (médiane 8 822 euros). Le coût extrapolé à toute la France a été estimé, d'après la même étude, à 163,1 millions d'euros. En Allemagne, une étude sur 37 hôpitaux et 2 767 cas d'ICD, a estimé un coût de 4 132 euros dans le cas où l'ICD est identifiée comme étant la cause d'admission et de 19 381 euros comme diagnostic secondaire (où les coûts des comorbidités sont importants). L'extrapolation des données indique un coût moyen de 464 millions d'euros pour les ICD sur le système de santé Allemand (55).

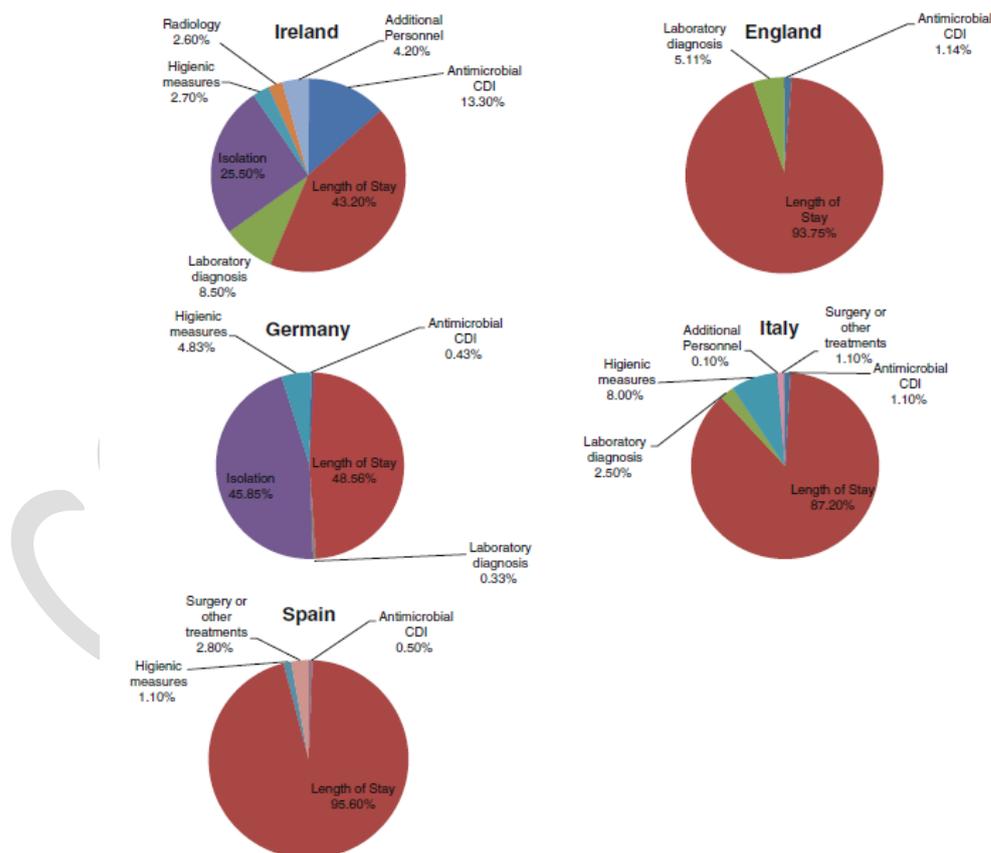


Figure 3. Répartition des coûts des infections à *Clostridium difficile* dans certains pays d'Europe. Le coût des ICD est principalement lié à la durée d'hospitalisation dans tous les pays européens faisant part de l'étude. En revanche, et d'une manière intéressante, le coût des antibiotiques utilisés pour le traitement des ICD ne représente que 1 % en moyenne du coût total de l'infection, sauf en Irlande où ce coût atteint 13,3 % du coût total. Les autres coûts des ICD sont liés à plusieurs autres mesures dont l'isolement des patients, le diagnostic, les mesures d'hygiène et les interventions chirurgicales (49).

Le coût des récurrences des ICD a été également étudié. Ainsi, le coût du premier épisode est estimé, par une étude espagnole, à 3 901 euros par cas, ce coût augmentant pour la première récurrence à 4 875 euros et à 5 916 euros pour une deuxième récurrence (56). Dans une autre étude multicentrique Italienne, le coût attribuable aux rechutes d'ICD est estimé à 17 714 euros par cas alors qu'il est de 14 936 euros par patient pour un seul épisode (57). Dans la même étude de Le Monnier et al. citée plus haut sur les 12 hôpitaux Français, le surcoût lié aux rechutes d'ICD est estimé à 7 514 euros par cas (9,5 millions d'euros en 2011 dans les 12 hôpitaux impliqués) ce qui est équivalent à 12,5 % du coût d'ICD total estimé dans cette étude (54). Comme indiqué précédemment, le coût associé aux ICD est principalement attribué à la durée d'hospitalisation des patients. Plusieurs études en Europe ont estimé le surcoût lié à la prolongation de la durée d'hospitalisation entre 43,2 et 95,6 % du coût total des ICD (Figure 3) (52,57,58). Ainsi, Wiegand et al. ont estimé, en 2012, la durée d'hospitalisation moyenne liée à l'ICD à 15 jours en Europe avec une variation entre les différents pays européens (51), alors que le coût lié aux antibiotiques utilisés pour le traitement des ICD ne représente que 0,43 à 13,3 % seulement du coût total des ICD (52,57,58).

I.2.4. Distribution des ribotypes de *C. difficile* en Europe

La progression de l'incidence des ICD est liée à plusieurs facteurs, y compris la sensibilisation des médecins au diagnostic, les algorithmes utilisés dans chaque pays pour ce diagnostic, ainsi que l'émergence mondiale de souches « épidémiques » avec des PCR ribotype (RT) particuliers, comme la souche 027. Cependant, des études épidémiologiques européennes récentes montrent que certains pays d'Europe ont réussi à contrôler la dissémination du clone 027, alors que d'autres pays ont récemment rapporté l'émergence d'autres souches virulentes, épidémiques ou inhabituelles.

Dans l'étude Pan-Européenne sur *C. difficile* menée en 2008 sur 106 laboratoires de 34 pays (Voir Chapitre I.2.2 Mortalité associée aux ICD), les auteurs ont identifié plus de 65 ribotypes à partir de 389 isolats de *C. difficile*. D'une manière intéressante, le ribotype 027 n'était pas prédominant en 2008 et ne représentait que 5 % des souches isolées. Les ribotypes les plus isolés étaient les RT 014/020 (16 %), 001 (9 %) et 078 (8 %). Certains RT ont été disséminés en fonction des régions, dont le RT 106 principalement décrit en Angleterre et Irlande (27). En revanche, dans l'Etude EUCLID, menée en 2012-2013 sur 482 hôpitaux dans 19 pays européens, la diversité des RT était beaucoup plus élevée que dans l'étude précédente, avec 125 RT isolées à partir de 1196 isolats (29). A l'inverse de la première étude, le RT le plus isolé était le 027 (19 %) soulignant la dissémination rapide de cette souche à l'échelle globale (Figure 4). Les RT 001/072 (11 %) et 014/020 (10 %) ont toujours été en tête du classement des RT en Europe, dans le même sens que dans l'étude de 2008. En revanche, la prévalence du RT 078 a chuté de 8 % en 2008 à 3 % en 2012-

2013. Cette distribution des RT était variable d'un pays à l'autre (Figure 4) (59). En Belgique par exemple, une étude multicentrique a isolé plus de 3 333 souches toxigènes entre 2010 et 2015 dans 110 hôpitaux Belges. Les RT 027 (4,2 %) et 078 (7 %) ont été associés à des complications plus sévères et à une production *in-vitro* plus élevée des toxines (60). D'autre part, Fawley et al. ont comparé les données épidémiologiques des ICD communautaires et nosocomiales dans 113 laboratoires en Angleterre entre 2011 et 2013. La distribution des RT a été similaire entre les deux type d'ICD, sauf pour le RT 002 qui était plus lié aux ICD communautaires alors que le RT 027 était plus associé aux ICD nosocomiales (61). En France, plusieurs études en 2013 et 2016 ont montré que les RT prédominants étaient les RT 014/020/077 (18,7 – 21,9 %) et 078/126 (9,5 – 12,1 %), alors que la prévalence du RT 027 reste faible (3 %) principalement isolé au Nord de la France (34). Au total, les RT 014/020 et RT 001/072 sont endémiques dans la quasi-totalité des pays européens, alors qu'il existe d'autres RT à spécificité nationale ou régionale, avec une augmentation générale de la diversité des ribotypes dans toute l'Europe.

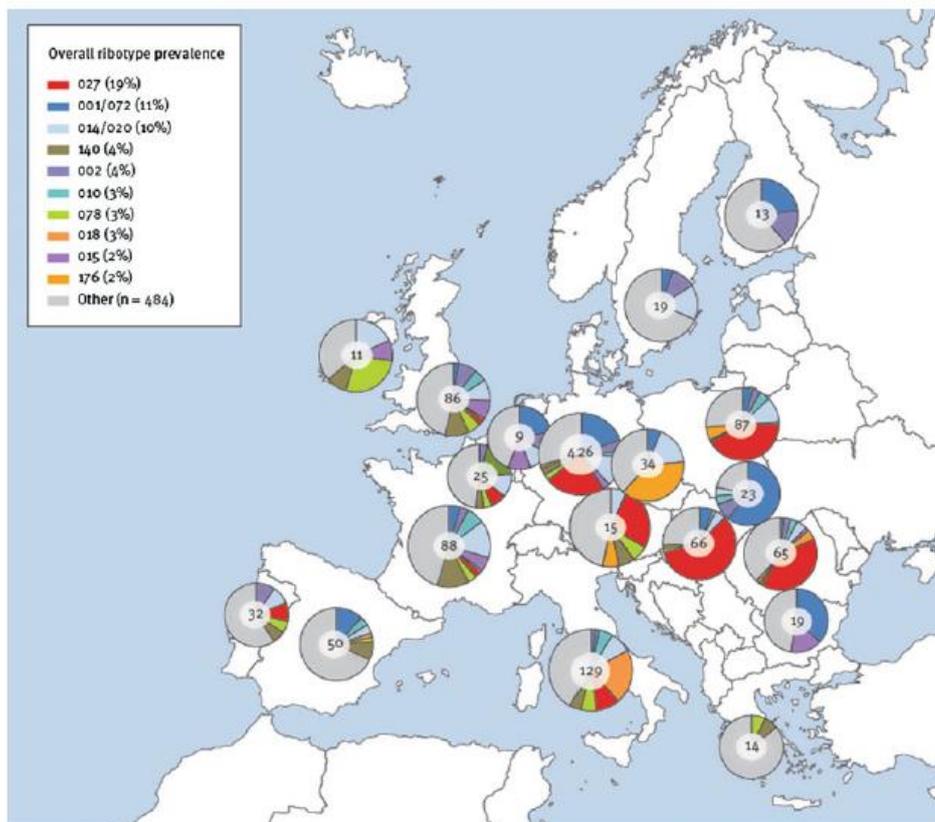


Figure 4. Distribution géographique des ribotypes PCR de *C. difficile*, par pays européens participants, EUCLID 2012-2013 et 2013 (n = 1196). Les disques montrent la proportion des ribotypes les plus courants par pays. Le nombre situé au centre des disques représente le nombre d'isolats typés dans le pays (59).

I.2.4.1. Particularités des souches épidémiques PCR-ribotype-027

En fonction de la méthode de typage utilisée, ces souches sont nommées PCR-ribotype 027 / PFGE (*pulse field gel electrophoresis*) type NAP1 (*North American pulsotype 1*) / toxinotype III / REA (*restriction endonuclease analysis*) groupe B1. La première souche 027 a été isolée en 1985 (62). En 2002, des épidémies provoquées par une souche 027 ont commencé à apparaître au Canada, induisant un nombre important de décès à Montréal (63). Cette souche a été ensuite isolée en 2005 de patients dans plusieurs pays dont les États-Unis, l'Angleterre, les Pays-Bas et dans plusieurs autres pays à travers le monde (63–67).

Les souches 027 présentent des différences génétiques considérables par rapport aux autres souches dont la souche 630 (souche clinique de référence, non épidémique PCR-ribotype 012), lesquelles peuvent conférer à ces souches des propriétés particulières, avec plus de 234 gènes supplémentaires modifiant ainsi leur mobilité, la survie, la résistance aux antibiotiques et la toxicité, ce qui contribue à accroître la gravité de la maladie, l'échec thérapeutique, la fréquence élevée de rechute et la dissémination du pathogène (68).

La souche 027 R20291, isolée lors d'une épidémie à Stoke Mandeville (Royaume-Uni) en 2006, est caractérisée par une délétion de 18 paires de base (pb) ainsi qu'une délétion en position 117 du gène *tcdC*, ce qui résulte en une inactivation de la protéine TcdC qui est un régulateur négatif de la production des toxines, augmentant ainsi la quantité des toxines produites (69). De plus, cette souche produit une autre toxine nommée toxine binaire qui pourrait également contribuer à sa virulence (70). Cette souche épidémique est également résistante aux fluoroquinolones en raison de la présence de 7 mutations ponctuelles au niveau du gène de l'ADN gyrase (68). D'autres différences génétiques existent entre la souche R20291 et la souche 630, et plus particulièrement dans le locus F2 codant les glycanes flagellaires (68,71). Ces modifications pourraient jouer un rôle important dans l'échappement au système immunitaire de l'hôte, l'agglutination, l'adhérence et la colonisation (68).

En outre, la souche 027 R20291 sporule pendant la phase de croissance exponentielle avec une efficacité beaucoup plus importante que la souche 630, ce qui augmenterait la capacité de la souche 027 à se répandre plus facilement dans l'environnement et, par conséquent, à provoquer des épidémies (72,73).

I.3. Facteurs de risques d'ICD

Le facteur de risque le plus significatif d'ICD est à l'évidence un épisode d'hospitalisation récent. Ainsi, l'hospitalisation fréquente et la durée de séjour prolongée a été identifiée comme un facteur de risque important d'ICD, puisque 94 % des cas d'ICD ont été associés à des hospitalisations (74). Il a été bien démontré que la contamination par *C. difficile* a lieu par voie oro-fécale, la transmission de personne à personne s'effectuant directement par manuportage ou à partir de l'environnement contaminé (74). En milieu hospitalier, les souches portées par des patients ayant une ICD sont très fortement disséminées. Il a été ainsi rapporté que plus de 49 % des prélèvements environnementaux de chambres de patients souffrant d'ICD sont positifs à *C. difficile* (75). De plus, la grande résistance des spores de *C. difficile* leur permet de résister à l'environnement et donc de persister pendant des semaines, voire des mois, sur des supports inertes (75–79). Cette dissémination est favorisée également par la promiscuité des patients, en effet une acquisition de *C. difficile* survient en moins de 4 jours chez un patient hospitalisé dans la même chambre qu'un patient porteur de *C. difficile* (75). La fréquence des soins est donc un risque de manuportage par les personnels soignants.

Le traitement par des antibiotiques représente également un risque majeur pour le développement des ICD. Pratiquement tous les antibiotiques ont été associés au développement des ICD, y compris le métronidazole et la vancomycine actifs contre *C. difficile* (80). Ainsi, quelle que soit la durée du traitement et la dose utilisée (en dose cumulative ou en dose unique pour la prophylaxie chirurgicale), les antibiotiques augmentent le risque d'ICD et favorisent la colonisation et l'infection par *C. difficile* (81–84). De plus, l'utilisation d'antibiotiques n'augmente pas seulement le risque d'ICD au cours de la durée du traitement, mais également dans les trois mois suivant l'arrêt de l'antibiothérapie, le risque le plus élevé ayant lieu pendant le premier mois de traitement (85). D'une manière importante, l'utilisation d'antibiotiques a été associée, durant et après le traitement, à des niveaux de guérison plus faible, une durée plus longue pour la disparition de la diarrhée et un risque accru pour les rechutes (86). Les antibiotiques altèrent la composition du microbiote intestinal ce qui favorise la rupture de son effet barrière permettant ainsi la colonisation et la multiplication de *C. difficile* (87). En effet, les antibiotiques utilisés pour le traitement des ICD pourraient contribuer eux-mêmes à la rechute, par leur activité non seulement sur *C. difficile* mais également sur les bactéries du microbiote intestinal, favorisant la perte de la résistance à la colonisation, mais également à la germination des spores, à la colonisation et à la prolifération des formes végétatives de *C. difficile* et donc à la réémergence de l'infection (86,88,89). Plusieurs classes d'antibiotiques semblent être plus favorisantes des ICD que d'autres, comme c'est le cas de la clindamycine, des céphalosporines et des fluoroquinolones (81,85).

Cependant, la fidaxomyline également utilisée dans le traitement des ICD semble avoir un effet moins important sur l'altération du microbiote intestinal, ce qui pourrait être à l'origine de la diminution des taux de rechutes chez les patients traités par cet antibiotique (89).

Les personnes âgées ont été historiquement considérées comme des patients à haut risque de développer des ICD. Plusieurs études ont montré que le risque d'ICD est plus élevé chez les personnes âgées de plus de 65 ans que chez les patients plus jeunes, et le taux de mortalité est plus important (28 %) chez les patients de plus de 60 ans comparé aux patients de moins de 60 ans (2,5 %) (45,90). Cette association semble être multifactorielle et expliquée en bonne partie par la diminution de la réponse immunitaire, une comorbidité plus élevée et une exposition accrue aux antibiotiques et à l'environnement hospitalier (91).

Les agents diminuant l'acidité gastrique, dont les inhibiteurs de la pompe à protons (IPP) et les antagonistes du récepteur de l'histamine-2 (H2RAs), ont été également associés à un risque accru d'ICD (92,93). Ainsi, le risque d'ICD augmente de 2,5 fois chez des patients traités par des IPP par rapport aux patients non traités, l'augmentation de ce risque étant encore plus importante (environ 44 fois) lorsque le traitement par les IPP est associé à une antibiothérapie ou à une chimiothérapie (94). Le mécanisme exact de la contribution de ces médicaments au risque d'ICD n'a toujours pas été élucidé, mais il peut être lié à la diminution de l'acidité gastrique ce qui permettrait aux formes végétatives d'atteindre le colon. Cependant les spores de *C. difficile*, responsables de l'infection, sont résistantes aux acides et restent viables au pH gastrique. Ces médicaments pourraient également contribuer à la perturbation du microbiote intestinal favorisant ainsi la colonisation par *C. difficile* (95). Il a été également montré que les IPP pourraient avoir un effet sur l'activité des neutrophiles intestinaux ce qui pourrait interférer avec les mécanismes de défense protectives contre l'ICD (96).

Récemment, comme déjà indiqué, les ICD commencent à apparaître en communauté, et même en l'absence d'une exposition aux antibiotiques (97). Les facteurs de risque des ICD communautaires ne sont pas encore bien élucidés, pourtant plusieurs facteurs pourraient contribuer à ces infections. Comme expliqué ci-dessus, l'utilisation des agents suppressifs de l'acide gastrique pourrait favoriser les ICD communautaires. Il a été montré que le tabagisme pourrait également contribuer à ces infections. Une étude a montré en 2012 que la prévalence des ICD était 80 % supérieure chez les fumeurs actuels et 30 % chez les anciens fumeurs, que chez les non-fumeurs (98). La transmission accrue de *C. difficile* en communauté pourrait également expliquer ce nouveau risque. Ainsi, *C. difficile* a été détecté dans différents environnements : dans l'environnement des patients récemment hospitalisés, dans les maisons familiales et surtout dans

les familles comportant des enfants âgés de moins de deux ans normalement fortement colonisés par *C. difficile* (mais porteurs sains), dans la nourriture vendue aux marchés, chez les animaux domestiques, entre autres (99–103).

D'autres facteurs de risque d'ICD ont été également décrits : les maladies inflammatoires chroniques intestinales (104,105), les transplantations d'organes (106,107), la chimiothérapie (108,109), la gravité de la pathologie sous-jacente (105,110), la maladie rénale chronique et l'immunodéficience (76,109).

I.4. Manifestations cliniques des ICD

La présentation clinique de l'ICD peut recouvrir différents stades de sévérité et tous les intermédiaires peuvent s'observer allant du portage asymptomatique, la diarrhée isolée sans colite, la colite sans pseudo-membranes, la colite pseudomembraneuse typique jusqu'à la colite fulminante et d'autres complications (Figure 5) (111,112).

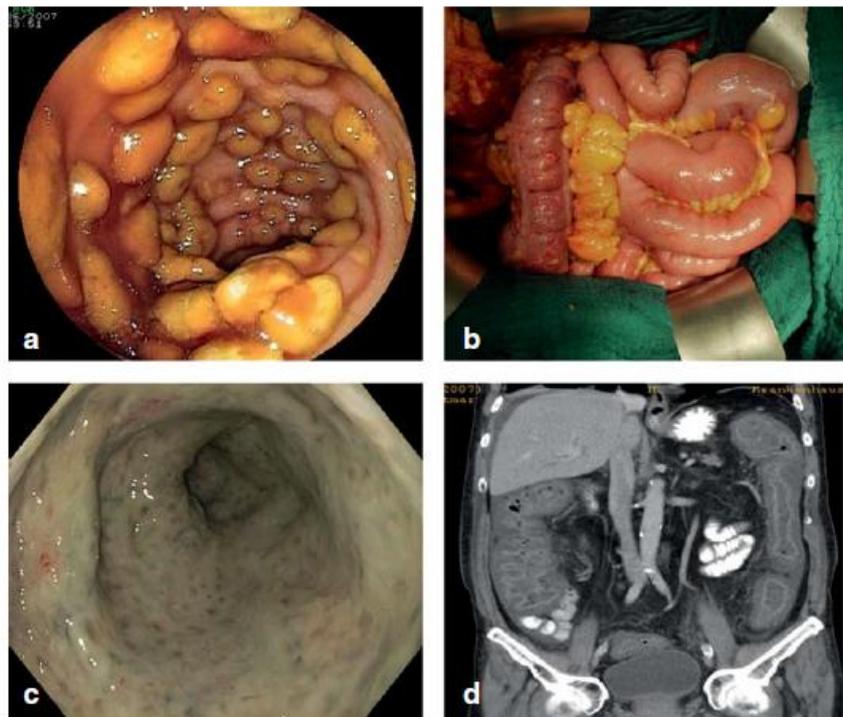


Figure 5. Images endoscopique, chirurgicale et radiologique d'une infection sévère à *Clostridium difficile*. a. Image endoscopique typique d'une colite pseudomembraneuse. b. Vue peropératoire d'un abdomen aigu d'un homme âgé de 70 ans présentant une ICD fulminante affectant le colon transverse. La chirurgie a pris la forme d'un lavage, sans résection du côlon. c. Image endoscopique d'une pancolite sévère associée à *C. difficile* chez un patient dialysé âgé de 71 ans. Les pseudomembranes individuelles ne peuvent plus être distinguées dans ce cas. d. Image par tomographie axiale (reconstruction frontale) montrant un fort épaissement de la paroi entière du côlon (112).

I.4.1. Portage asymptomatique

Quelle que soit l'origine communautaire ou hospitalière de l'ICD, il est important de faire la distinction entre la colonisation et la maladie ; le portage et la colonisation représentent en effet des termes controversés. Le portage est défini comme l'hébergement de la bactérie dans le microbiote intestinal sans symptômes d'ICD, alors que la colonisation fait partie du processus pathologique de l'ICD (113). Le portage asymptomatique est commun dans les établissements de santé et en communauté, et il peut avoir lieu par des souches toxigènes ou non toxigènes (114,115).

Dans les hôpitaux, le pourcentage de portage asymptomatique varie entre 7 et 18 %, en fonction de la durée de séjour et de l'exposition aux antibiotiques (79). La proportion de portage asymptomatique en communauté est plus faible que dans les hôpitaux et varie entre 2 et 4 %. Il a été également rapporté que le taux de portage asymptomatique chez les enfants jusqu'à l'âge de deux ans peut atteindre 70 à 80 % (100).

Le portage asymptomatique des souches non-toxigènes de *C. difficile* a été considéré comme un facteur de protection contre les ICD, mais ce concept est controversé par plusieurs études récentes (116,117). D'autre part, les porteurs asymptomatiques pourraient contribuer à la dissémination des spores dans l'environnement et à d'autres patients (77).

I.4.2. Diarrhées à *C. difficile*

L'infection à *C. difficile* se présente le plus souvent sous la forme d'une diarrhée isolée modérée, sans altération de l'état général, sans glaire ni sang visible, quelques fois accompagnée par une fièvre modérée et des douleurs abdominales de type spasmodiques (80,118). Les symptômes apparaissent typiquement 48 à 72 heures après l'infection, mais parfois plusieurs semaines après. L'examen clinique est en général normal, de même que la colonoscopie lorsqu'elle est réalisée. Dans les formes simples d'ICD, la diarrhée disparaît généralement à l'arrêt de l'antibiotique responsable (119).

I.4.3. Colites à *C. difficile*

En cas de colite à *C. difficile*, les manifestations cliniques sont plus sévères que lors de diarrhées. Les formes simples de colites sont associées à des douleurs abdominales et des diarrhées plus importantes, avec une leucocytose et de la fièvre. La colonoscopie révèle une muqueuse inflammatoire et érythémateuse (120).

C. difficile est responsable de plus de 95 % des cas de colites pseudomembraneuses (CPM) qui ont lieu dans 10 % des cas d'ICD (80). Ces colites sont associées à des diarrhées abondantes, hétérogènes et non sanglantes, une fièvre, des douleurs abdominales souvent sévères et des signes de déshydratation extracellulaire (80). Les signes biologiques de l'inflammation (augmentation de la protéine C réactive et hyperleucocytose, souvent supérieure à 20 000/mm³), sont habituellement présents. A l'endoscopie, la muqueuse colique est recouverte de pseudomembranes, des plaques surélevées jaunâtres éparses ou confluentes selon le stade de la maladie, à l'origine d'ulcérations de la muqueuse (Figure 1) (111). L'analyse histologique des biopsies de ces pseudomembranes met en évidence une nécrose superficielle de la muqueuse, un exsudat fibrino-leucocytaire et une accumulation de débris tissulaires et de mucus (121). Ces lésions sont plus fréquemment visibles dans le côlon proximal et peuvent être absentes au niveau rectal. Les pseudomembranes sont attachées à la muqueuse et ne s'en détachent que difficilement (80).

I.4.4. Complications

La proportion des formes sévères est estimée à 10 % de l'ensemble des ICD (33). Les CPMs pourraient évoluer en colites fulminantes et provoquer des complications toxiques, dont la colite fulminante, le choc septique, le mégacôlon toxique (dilatation massive du colon) ou la perforation digestive (34). La colite fulminante survient chez 3 à 8 % des patients infectés par *C. difficile* (122). Elle est fréquemment associée à une défaillance multi-organique avec un taux de mortalité élevé. Les patients présentent une distension abdominale, des douleurs abdominales sévères, une instabilité hémodynamique et une hyperleucocytose. Ainsi, ces complications doivent faire l'objet d'une prise en charge médicochirurgicale afin d'éviter d'autres complications et la mort (123).

I.4.5. Récidives

Les récurrences peuvent survenir en général 3 jours à 8 semaines après l'arrêt du traitement antibiotique du premier épisode de diarrhée à *C. difficile* (121). Le taux de rechute associé à l'ICD est élevé avec des taux rapportés de 20 % en moyenne (124). Les rechutes peuvent être multiples, ainsi le risque d'une seconde récurrence serait de 65 % (124).

Une récurrence peut être due à la même souche de *C. difficile* responsable du premier épisode infectieux, par germination de spores persistantes après un traitement antibiotique auquel elles sont résistantes, ou à l'acquisition d'une nouvelle souche toxigène de *C. difficile* (réinfection), suite au contact avec les surfaces contaminées ou avec les porteurs sains ou malades. Le taux de réinfection serait ainsi de 38 à 56 % (121,125,126).

Le tableau clinique en cas de récurrence serait plus sévère, les patients auraient une douleur abdominale plus importante, une fièvre plus élevée et ils feraient plus souvent une colite que lors du premier épisode d'ICD (124).

I.4.6. Autres infections à *C. difficile*

D'autres organes peuvent être infectés par *C. difficile*, et lorsque la bactérie est isolée à partir des sites extra-intestinaux, d'autres espèces bactériennes sont souvent présentes (infection polymicrobienne), en particulier lorsque le site de l'infection se situe à proximité du côlon, ce qui peut donc correspondre à des contaminations fécales (127–130). Des atteintes de l'intestin grêle ont été souvent associées à des procédures chirurgicales précédentes de ce site et associée à un taux de mortalité élevé (4 décès parmi les 7 patients rapportés) (131). De plus, l'inflammation du côlon, dans le cas des colites pseudomembraneuses, peut conduire au développement d'une bactériémie transitoire par translocation bactérienne ; ainsi, 15 cas de bactériémie à *C. difficile* ont été rapportés, dont la moitié des patients sont décédés au cours de la semaine suivant l'infection (131,132).

Associées ou non à une atteinte intestinale, les localisations extra-digestives des ICD sont rares : pleurésie, septicémie, abcès splénique ou pancréatique, fasciite nécrosante, arthrite réactionnelle du genou et du poignet, ostéomyélite, infections prothétiques (131).

I.5. Diagnostic des ICD

Le diagnostic des ICD reste un défi, puisqu'il n'existe toujours pas de techniques optimales de laboratoire ou même de tests universels uniques de référence. Cependant, la standardisation de l'une des deux méthodes de référence suivantes est en débat : la démonstration de la présence des toxines responsables des manifestations cliniques dans les selles par le test de cytotoxicité des selles (CCNA pour *cell cytotoxicity neutralisation assay*), ou la démonstration de la présence de *C. difficile* produisant les toxines par le test de la culture toxigénique (TC pour *toxigenic culture*) (113).

Le CCNA consiste en l'inoculation *in vitro* de l'échantillon de selle filtré dans une culture d'une monocouche cellulaire, en utilisant des lignées cellulaires comme les cellules Vero, cellules HeLa ou cellules Hep-2. Après 24 à 48 heures, les cultures sont observées pour évaluer la morphologie des cellules sous l'effet de la toxine TcdB (si présente) qui cause un arrondissement des cellules (133). D'autre part, pour le TC, les échantillons de selles sontensemencés dans un milieu sélectif et incubés pendant au moins 48 h. Les colonies suspectées de *C. difficile* (coloration de Gram,

morphologie des colonies, odeur, fluorescence sous UV...) sont ensuite isolées et leur capacité à la production de toxine est évaluée *in vitro*, soit par la même méthode de cytotoxicité des selles expliquée ci-dessus, soit par un test de type ELISA (ou *enzyme immunoassay EIA*) pour la mise en évidence des toxines TcdA et TcdB (Tox A/B EIA, voir ci-dessous), ou encore par un test de recherche des gènes des toxines par des méthodes d'amplification des acides nucléiques (*NAAT nucleic acid amplification test*) (113).

Un débat a eu lieu ces dernières années sur le meilleur test à utiliser pour le diagnostic des ICD. Ainsi, le CCNA permet la détection des toxines *in vivo*, alors que le TC permet la détection des toxines *in vitro*. Ce dernier test n'est pas capable de différencier le portage asymptomatique des souches toxigènes de *C. difficile* des vraies ICD. Des études ont montré que les patients qui étaient CCNA-positif ou Tox A/B EIA-positif avaient des pronostics plus sévères que les patients qui étaient TC-positif uniquement, ce qui indique que cette dernière catégorie de patients pourrait potentiellement concerner des porteurs asymptomatiques plutôt que des patients atteints d'ICD ; ceci indique également que ce test augmente artificiellement le taux de détection et le chiffres d'incidence des ICD (134). Cependant, le CCNA souffre d'un manque de standardisation des conditions de collecte et de stockage des échantillons, ce qui risque de générer des résultats faux-positifs. Les deux méthodes sont laborieuses, coûteuses et nécessitent des personnels formés.

Pour ces raisons, des tests faciles et rapides ont été développés, et sont donc actuellement utilisés principalement en clinique pour le diagnostic des ICD. Cependant, chacun de ces tests possède ses avantages et ses inconvénients.

Le premier test, Tox A/B EIA, détecte directement les toxines libres dans les selles, et il permet alors une corrélation avec les symptômes cliniques (134). Ce test est rapide, facile et pas onéreux. Cependant, la sensibilité de ce test n'est pas optimale. En comparant avec le CCNA, la sensibilité totale de Tox A/B EIA est estimée à 83 %, alors qu'elle est encore plus faible en comparant avec le TC où elle atteint 57 %. En revanche, ce test possède une spécificité élevée (99 %) par rapport aux deux tests TC et CCNA (135).

Le deuxième test utilisé est le test de la détection de la glutamate déshydrogénase (GDH) par une technique EIA, qui est également rapide, facile et peu onéreux. La GDH est une enzyme produite par les différentes souches toxigènes et non toxigènes de *C. difficile*. Ce test est sensible, avec une sensibilité totale de 94 % et 96 % par rapport aux tests CCNA et TC, respectivement (135). En revanche, ce test ne permet pas la différenciation des souches toxigènes et non-toxigènes, et détecte donc moins spécifiquement les vraies ICD. Ceci se traduit par la faible spécificité de ce test qui est à 90 % en comparaison avec le test CCNA (135).

D'autres tests basés sur des méthodes d'amplification d'acides nucléiques ou NAAT sont également utilisés pour le diagnostic des ICD. Ces tests incluent la PCR (*polymérase chain réaction*), l'amplification hélicase-dépendante et l'amplification *loop-mediated isothermal* (135). La majorité de ces tests cible les régions conservées dans le gène de la toxine TcdB (*tcdB*), mais certains ciblent également une séquence hautement conservée dans le gène de la toxine TcdA (*tcdA*). D'autres tests permettent également la détection de la souche 027/NAP1, par la détection des gènes de la toxine binaire CDT (*cdt*) et la délétion au nucléotide 117 dans le gène régulateur *tcdC* (136). Les NAATs sont sensibles (96 % et 95 % en comparant respectivement avec CCNA et TC) (135), et plus spécifiques que les GDH EIAs, puisqu'ils ne détectent que les souches toxigéniques au lieu de toutes les souches de *C. difficile* (spécificité à 94 % et 98 % en comparant respectivement avec les CCNA et TC) (137). Cependant, les NAATs détectent uniquement les gènes de toxines ce qui va conduire à l'absence de détection du portage asymptomatique des souches non toxigènes de *C. difficile* (136).

Bien que ces méthodes soient rapides et pratiques, les résultats des tests GDH EIA et le NAAT ne sont pas corrélés directement aux symptômes cliniques ce qui conduit à un sur-diagnostic de l'ICD. D'autre part, aucun de ces trois tests, y compris le Tox A/B EIA, n'est suffisamment spécifique pour être utilisé tout seul dans le diagnostic des ICD (137). Ainsi, dans une étude, les valeurs de prédictions positives du test le plus spécifique (Tox A/B EIA) varient entre 69 % et 81 %, indiquant que 19 à 31 % des échantillons soumis au diagnostic d'ICD avec un résultat positif ne correspondent pas à des ICD (137). Compte-tenu de ces limitations, la *European Society of Clinical Microbiology and infectious Diseases (ESCMID)* et les *Society for Healthcare Epidemiology of America/The infectious Diseases Society of America (SHEA/IDSA)* proposent d'utiliser des algorithmes de diagnostic des ICD pour augmenter au maximum la précision de détection des ICD (Figure 6) (136). Selon ces algorithmes, plusieurs tests doivent être effectués d'une manière séquentielle, débutant par des tests hautement sensibles dont le GDH EIA ou NAAT, ainsi la sensibilité de ces tests permet d'affirmer l'absence d'une ICD en cas de résultat négatif. En revanche, si le premier test est positif, le deuxième test doit être alors un test hautement spécifique dont le Tox A/B EIA ou le CCNA, permettant d'affirmer la présence de l'ICD si le résultat est positif (137,138). Ces algorithmes ont leur propre inconvénient : le temps d'exécution accru. Alors qu'un résultat négatif peut rapidement exclure le diagnostic d'une ICD, un diagnostic positif d'ICD nécessite deux tests positifs et prend inévitablement plus de temps, surtout si le CCNA est utilisé comme deuxième test tel que recommandé par l'IDSA / SHEA. Ceci est un inconvénient de poids, car il a été montré que la diminution du temps de diagnostic impacte positivement l'évolution de la maladie chez le patient (139).

Les méthodes de diagnostic des ICD restent imparfaites et des stratégies alternatives sont en cours d'étude comme par exemple la détection de biomarqueurs fécaux, de cytokines et d'interleukines immunomodulatrices et les méthodes d'imagerie. Ces stratégies pourraient aider non seulement dans le diagnostic des ICD mais également dans la prédiction de la sévérité et le pronostic des ICD. Cependant, elles ne sont pas encore disponibles pour remplacer les stratégies conventionnelles de diagnostic des ICD (136).

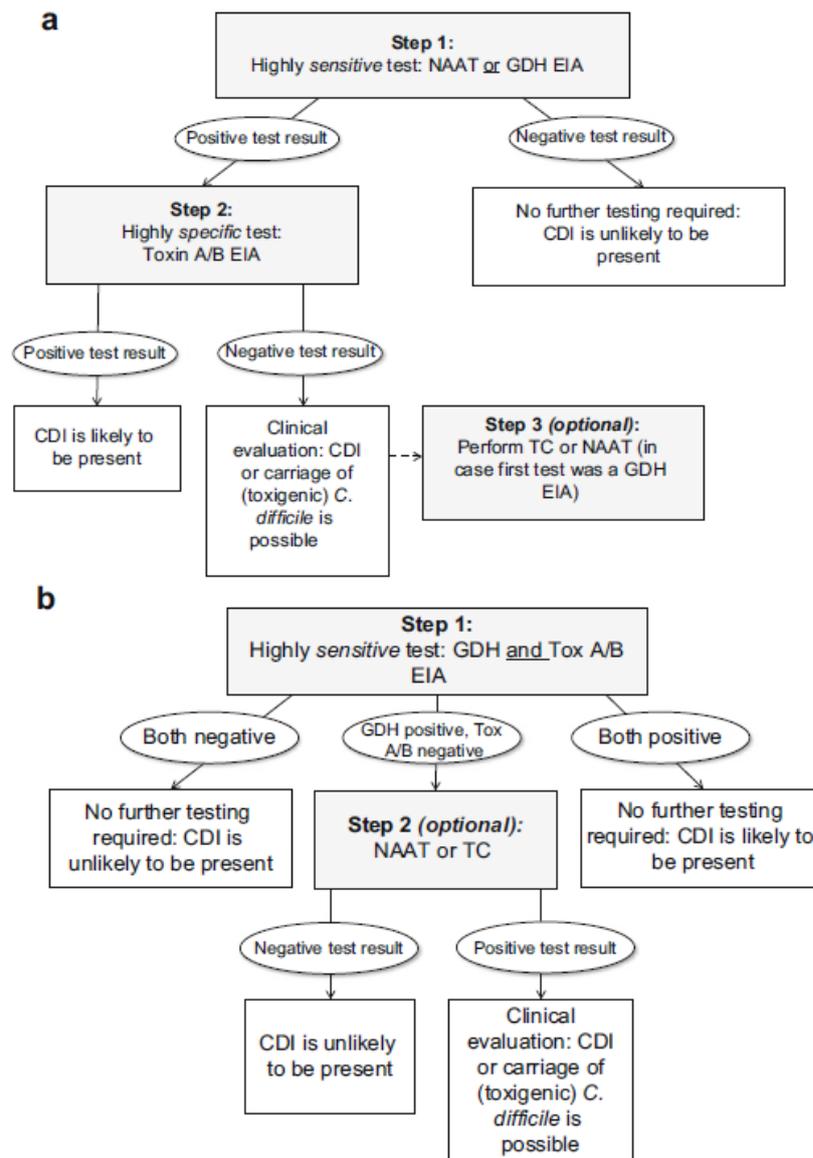


Figure 6. Algorithmes de diagnostic des infections à *C. difficile* selon les recommandations de l'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). a. Algorithme GDH ou NAAT-Tox A / B, b. Algorithme GDH et Tox A / B - NAAT / TC. Dans les deux modèles proposés, le premier test à effectuer est un test hautement sensible permettant l'affirmation de l'absence d'une ICD alors que le deuxième test doit être hautement spécifique pour éviter les résultats faux-positifs. GDH = glutamate déshydrogénase, NAAT = Test d'amplification d'acide nucléique, TC = culture toxigène, Tox A / B, toxine TcdA / TcdB ; EIA = test immunoenzymatique (136).

I.6. Traitement des ICD

Après le diagnostic d'une ICD, les premières mesures doivent inclure l'évaluation de la possibilité d'arrêt de l'antibiotique en cause, ce qui pourrait suffire à la guérison de l'ICD dans 25 % des formes simples (120). Si c'est possible, dans les formes simples d'ICD sans facteur de risque (fièvre > 38,5 °C, lactate sérique > 3,5 mmol/l, leucocytes > 15 000/mm³, créatinine sérique > 2 fois le niveau préalable, sérumalbumine < 3 g/dL, âge > 65 ans, comorbidités graves comme le diabète sucré, l'insuffisance rénale, immunosuppression) (140), le médecin peut attendre le rétablissement clinique naturel pendant 48 h sans initier un traitement spécifique, sans risque d'exacerbation de l'état du patient. Néanmoins, l'observation attentive de l'état clinique et des paramètres de laboratoire (par exemple, numération leucocytaire, CRP, albumine sérique, créatinine) est nécessaire pour minimiser le risque de détérioration soudaine (141).

Les ICD doivent être traitées en fonction de la sévérité de la maladie. Plusieurs facteurs pourraient représenter des critères de diagnostic pour la prédiction des formes sévères de l'infection. Ainsi, pour une prévention et un traitement optimal des complications, il est important de déterminer un score de risque individuel pour chaque patient. Dans une étude multicentrique en 2011, trois facteurs ont été identifiés pour la prédiction des formes graves (définies comme des formes d'ICD ayant besoin d'admission aux soins intensifs, de colectomie ou celles à risque de mortalité attribuée à l'infection dans moins de 30 jours après le diagnostic) : 1) la distension abdominale, 2) la numération leucocytaire > 20 000/ mm³ et 3) l'hypoalbuminémie (< 3 g / dl) (142). Dans une autre étude prospective aux Pays-bas, d'autres facteurs indépendants pour la prédiction des complications ont été identifiés : l'âge (≥ 85 ans ; 50-84 ans), l'admission due à la diarrhée, le diagnostic au service des soins intensifs, une chirurgie abdominale récente et l'hypotension artérielle (143). Ainsi, un traitement adapté devrait être administré aux patients atteints d'ICD remplissant des critères de risque des formes graves de l'infection.

I.6.1. Traitement antibiotique

Des recommandations européennes actualisées ont été proposées par l'ESCMID sous forme d'algorithme pour la prise en charge des ICD en fonction de la sévérité de l'infection et des risques de rechute (Figure 7) (144). Dans les formes simples ou modérées de l'ICD, le métronidazole est encore souvent recommandé comme première ligne de traitement grâce à son efficacité modérée et son prix faible (145). Cependant, si les symptômes ne disparaissent pas après 5 à 7 jours, un traitement par la vancomycine est indiqué (146).

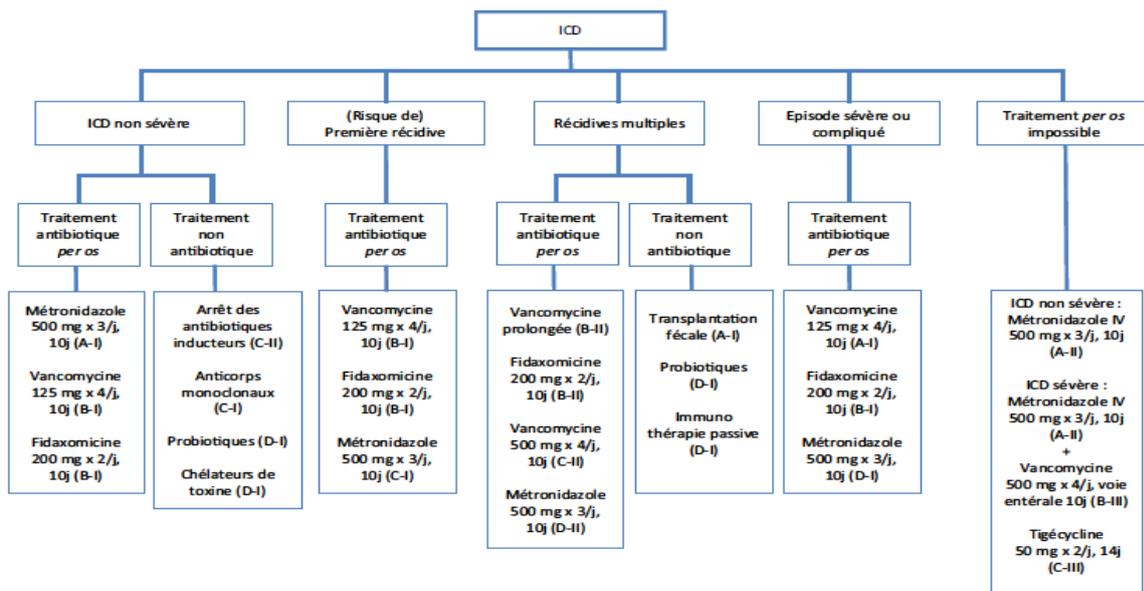


Figure 7. Algorithme de prise en charge des infections à *C. difficile* selon les recommandations de l'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Degré de Recommandation A = fort, B = modéré, C = marginal, D = pas de recommandation. I = preuve d'au moins un essai clinique proprement contrôlé et randomisé ; II = preuve à partir d'au moins un essai clinique, sans randomisation, d'études de cohortes ou cas-témoins (de préférence de plus d'un centre), à partir de plusieurs séries, ou résultats spectaculaires d'expériences non contrôlées ; III = opinions exprimées par des autorités respectées, fondées sur l'expérience clinique, des études de cas descriptives ou des rapports de comités d'experts. Chirurgie non incluse dans cet algorithme ; une augmentation de la dose de vancomycine à 500 mg x4/j pour 10 jours peut être envisagée (B-III) ; Il n'y a pas de preuves sur l'utilisation de fidaxomicine dans les formes sévères d'ICD (D-III) (144).

En présence de certains facteurs de risque de formes sévères de l'infection, le traitement par la vancomycine doit être initié. Il a été montré que la vancomycine et le métronidazole ont la même efficacité dans le traitement des formes simples, alors que, dans les formes sévères de l'infection, la vancomycine semble être plus efficace (97 % vs 76 % pour le métronidazole) (147–149). Dans deux essais cliniques multinationaux randomisés, le traitement par la vancomycine a été efficace dans 78,5 % des patients atteints d'ICD, alors que cette proportion n'était que de 63 % pour le métronidazole. De plus, la vancomycine a été associée à des taux supérieurs de succès clinique que le métronidazole, cette fois-ci sans rapport avec la sévérité de l'infection (147,148). Ces différences peuvent être corrélées aux différentes concentrations de ces deux antibiotiques retrouvés dans le côlon. En effet, des fortes concentrations de vancomycine y sont retrouvées, du fait de la non absorption de cet antibiotique lorsqu'il est administré par voie orale (VO), alors que les concentrations de métronidazole sont faibles et parfois en dessous des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des souches (148). Dans les formes sévères de l'infection avec complications, il a été suggéré d'utiliser une combinaison du métronidazole par voie intraveineuse (IV) et de la vancomycine par VO (138). Récemment, une étude rétrospective a analysé la mortalité des

patients avec des formes sévères et compliquées de l'infection traités soit par la vancomycine par VO seule, soit par la combinaison suggérée. Le taux de mortalité a été significativement inférieur dans le groupe traité par la combinaison des deux antibiotiques comparé au groupe traité par la vancomycine (150). La supériorité de la vancomycine par rapport au métronidazole est également soulignée par la durée nécessaire pour la résolution des symptômes dans les formes sévères d'ICD. Cette durée est estimée à 2,5 – 4 jours pour la vancomycine et à 3,2 – 6 jours pour le métronidazole (151–153).

Les taux de rechutes après un traitement initial efficace par la vancomycine ou le métronidazole sont similaires. Dans des essais cliniques randomisés et contrôlés, le taux de rechutes était de 6 à 38 % après un traitement par le métronidazole et de 4 à 33 % après un traitement par la vancomycine (149,151,153). Cependant, le métronidazole ne doit pas être administré pour plus d'une récurrence à cause de ses effets secondaires incluant la neuropathie périphérique, les crises convulsives et des problèmes d'interaction médicamenteuse (154). Pour une deuxième récurrence, la vancomycine (en schéma thérapeutique à décroissance ou intermittent) est plutôt recommandée (155).

Une autre molécule a permis récemment de diminuer le taux de rechute d'ICD : la fidaxomicine. Cette molécule a obtenu en 2012 l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement des ICD. C'est un antibiotique macrocyclique, administré par VO, faiblement absorbé, qui agit principalement au niveau de la lumière intestinale et atteint des concentrations fécales élevées. La fidaxomicine agit en inhibant la synthèse d'ARN chez *C. difficile* et en réduisant la production de toxines et de spores. Elle est également caractérisée par son spectre étroit avec, en particulier, une absence d'activité sur les bacilles à Gram négatif et sur les *Bacteroides*, réduisant ainsi relativement son impact sur le microbiote intestinal par rapport aux autres antibiotiques (89,156). Dans les premières études en 2011, la fidaxomicine a montré une non-infériorité à la vancomycine et elle a permis une guérison clinique après 10 jours de traitement (critère principal des études) dans environ 92 % des cas, d'une manière similaire à la vancomycine (153,157). D'autre part, la fidaxomicine est associée à un taux plus faible de rechute en comparaison avec la vancomycine à 25 jours après le traitement, avec un taux de rechutes à 12,7 % vs 26,9 % pour la vancomycine (153). Dans une autre étude récente sur un groupe de 72 patients en Espagne, la fidaxomicine a permis un taux de guérison clinique d'environ 96 % avec seulement 12 % de rechutes (158). En revanche, la fidaxomicine semble être plus efficace dans le traitement des infections par des souches autres que la souche 027. L'analyse des données de deux essais cliniques a montré que les patients infectés par la souche 027 de *C. difficile* avaient des taux de guérison inférieurs à ceux infectés par les autres souches (86 % vs 94,3 %) après le traitement par la fidaxomicine. Dans cette

même étude, une absence de différence significative a été observée dans le taux de rechute des patients infectés par la souche 027 traités par la fidaxomicine ou par la vancomycine (31,3 % pour la vancomycine vs 23,3 pour la fidaxomicine) (159). Le coût de la fidaxomicine représente un autre point faible de cette molécule. Le coût moyen d'un traitement de dix jours par la fidaxomicine à 200 mg excède de dix fois le coût du traitement par la vancomycine, mais ce coût reste à discuter par rapport à l'efficacité de cette molécule et son rôle dans la réduction de la durée d'hospitalisation par la réduction du taux de rechutes (145,160).

A ce jour, il n'a pas été établi une indication de la fidaxomicine en monothérapie dans les formes sévères de l'infection, mais son efficacité et le taux faible de rechute associé ont fait que la majorité des recommandations des sociétés savantes (*guidelines*) recommande son utilisation dans les cas de rechutes sans complications ou lors d'un premier épisode mais à haut risque de rechute.

D'autres antibiotiques ont été testés dans le traitement des ICD et semblent avoir la même efficacité que la vancomycine. La teicoplanine administrée par VO aurait une efficacité clinique équivalente à celle de la vancomycine pour le traitement des ICD (> 90 %). De Lalla et al. ont retrouvé un taux de récurrences plus faible avec la téicoplanine qu'avec la vancomycine (7,7 % vs 20 %) (161,162). Par ailleurs, deux études ont rapporté l'efficacité de la tigécycline par voie IV sur des petites séries de cas d'ICD sévères réfractaires aux traitements classiques par métronidazole et vancomycine. Un seul des 4 patients traités n'a pas guéri, les autres ayant guéri sans récurrence après un traitement de 15 à 30 jours (163,164). La rifaximine a également été étudiée dans un certain nombre de cas d'ICD récidivants après un traitement par vancomycine. Sept patients sur huit ont guéri sans récurrence après 2 semaines de traitement à la rifaximine (165,166). L'émergence rapide de résistance semble cependant poser un problème pour l'utilisation de cette molécule.

1.6.1.1. Résistance de *C. difficile* aux antibiotiques

Comme indiqué, les antibiotiques représentent le facteur de risque majeur des ICD. Toutefois, *C. difficile* est une bactérie sporulée et les spores peuvent survivre au traitement antibactérien pour germer ensuite et provoquer des récurrences après l'arrêt du traitement. *C. difficile* est connu pour être résistant à plusieurs antibiotiques, dont les aminoglycosides, la lincomycine, les tetracyclines, l'érythromycine, la clindamycine, les pénicillines, les céphalosporines et les fluoroquinolones, classiquement utilisés pour le traitement des infections bactériennes en clinique (167,168). La clindamycine, les céphalosporines et les fluoroquinolones sont connues pour favoriser les ICD. La résistance à la seconde génération des céphalosporines (céfotétan et céfoxitine) et des fluoroquinolones (ciprofloxacine) est très répandue et elle atteint respectivement 79 % et 99 % des souches testées. Une proportion plus faible est rapportée pour la résistance aux céphalosporines

de troisième génération (ceftriaxone et céfotaxime ; 38 % des souches testées) et aux fluoroquinolones à large spectre (moxifloxacine et gatifloxacine ; 34 % des souches testées) (167).

La résistance de *C. difficile* aux antibiotiques communément utilisés pour le traitement des infections bactériennes contribue non seulement à l'apparition et aux rechutes des ICD, mais également aux modifications épidémiologiques et à l'émergence de nouveaux clones (167). Par exemple, l'émergence et la propagation mondiale de la souche 027/BI/NAP1 a été certainement corrélée à l'utilisation très large et fréquente des fluoroquinolones (167,169).

Le métronidazole et la vancomycine, représentant la première ligne de traitement des ICD, restent efficaces dans la majorité de cas d'infections mais des souches de *C. difficile* sont isolées avec une susceptibilité à ces antibiotiques significativement réduite, et particulièrement celles avec une résistance au métronidazole (170,171). Le nombre de cas d'échec de traitement des ICD par le métronidazole a remarquablement augmenté dans les dernières années (172). Ainsi, de nombreux cas de résistance de *C. difficile* au métronidazole et à la vancomycine ont été rapportés dans différentes régions du monde. Une surveillance pan-européenne longitudinale de la résistance aux antibiotiques des ribotypes prévalents de *C. difficile* a montré que 0,11 % des souches testées étaient résistantes au métronidazole et 2,29 % des souches étaient résistantes à la vancomycine (173). Aux États-Unis (Texas), entre 2007 et 2011, 13 % des souches testées étaient résistantes au métronidazole (174). En Chine, 15,6 % des souches cliniques isolées entre 2012 et 2015 étaient résistantes au métronidazole (175). Au Moyen Orient, la résistance de *C. difficile* a atteint, en Iran en 2011, 5,3 % au métronidazole et 8 % à la vancomycine. La résistance au métronidazole s'élève à 67,4 % des échantillons des selles de patients atteints d'ICD testés entre 2010 et 2016 à partir de 4 hôpitaux à Téhéran sans résistance à la vancomycine rapportée (170,176). A Jérusalem, 18,3 % des souches testées étaient résistantes au métronidazole et 47 % des souches ribotypes 027 isolées ont été résistantes à la vancomycine (171). La résistance à la vancomycine ne semble pas affecter l'efficacité du premier traitement des ICD, grâce aux concentrations élevées présentes dans lumière intestinale (10 g/litre de fèces après administration par VO) mais ces données posent un vrai problème potentiel pour le traitement des ICD par la vancomycine et le métronidazole à l'avenir (177). *C. difficile* développe également une résistance à d'autres options thérapeutiques dont la rifamycine (57 %), la tétracycline et le chloramphénicol (173,178–180).

I.6.2. Traitements non antibiotique des ICD

Compte tenu du fait que la perturbation du microbiote intestinal est indispensable pour le développement des ICD, la restauration d'un microbiote normal représente donc une stratégie prometteuse permettant de limiter la prescription d'antibiotiques. La transplantation de

microbiote fécal (TMF) consiste à administrer une préparation de matière fécale issue d'un sujet sain à un patient atteint d'une pathologie liée à une altération du microbiote intestinal. La TMF est actuellement proposée pour : 1) les cas de récurrences après trois épisodes ou plus d'ICD simple ou modérée et un échec du traitement par antibiotiques après 6 à 8 semaines, 2) deux épisodes ou plus d'ICD sévère nécessitant une hospitalisation, 3) une ICD modérée sans réponse clinique après une semaine de traitements classiques et 4) une ICD fulminante ou sévère sans réponse clinique après 48 h de traitement (181,182). L'efficacité de la TMF dans le traitement des ICD a été analysée dans la revue systématique de Gough et al. sur 317 patients traités à partir de 27 séries de cas cliniques. Il en ressort que la TMF à partir de donneurs sains s'est avérée très efficace, permettant une guérison de l'ICD dans 92 % des cas. Cette efficacité varie en fonction des voies d'administration (rectale, nasogastrique ou nasojejunale), des volumes administrés, des pré-traitements avant l'infusion et de l'origine du donneur (183). Cependant, des études sur la sécurité de cette approche sur le long terme restent nécessaires. Chez des patients immunodéprimés, des effets secondaires importants sont survenus après une TMF mais il n'est pas clairement établi que ces effets puissent lui être attribués directement (184).

Une autre approche thérapeutique pour le traitement des ICD, et plus particulièrement pour la prévention des récurrences, consiste à utiliser des souches non toxigènes de *C. difficile* mais qui sont capables tout de même de coloniser le côlon et d'entrer en compétition avec les souches toxigènes (116). Ainsi, l'administration d'une formulation liquide contenant des spores d'une souche non toxigène, NTCD-M3, après un traitement efficace de l'ICD par la vancomycine ou le métronidazole, a réduit significativement le taux de récurrences (11 % vs 30 %) (185).

De plus, l'administration d'anticorps dirigés spécifiquement contre *C. difficile* ou ses toxines constituent une autre alternative thérapeutique contre les ICD. Cette approche a montré une efficacité comparable à celle du métronidazole dans la prévention des récurrences (186). Cependant, cette stratégie reste plus coûteuse que les autres thérapies contre les ICD (187). Par ailleurs, des molécules capables de fixer les toxines de *C. difficile* ont été testées pour bloquer leurs effets pathologiques comme le Tolevamer (sulfonate de polystyrène), mais cette molécule a montré une efficacité inférieure à celle des antibiotiques utilisés pour le traitement des ICD (taux de guérison de 46 % pour le Tolevamer vs 81 % et 72 % respectivement pour le métronidazole et la vancomycine) (188). Enfin, l'indication de la chirurgie (colectomie) ne devrait être considérée que chez une minorité des patients (< 5 %) avec des ICD graves ayant développé une colite fulminante, un mégacolon toxique ou un iléus sévère, qui sont associés à un taux élevé de mortalité (jusqu'à 40 %) (189).

Concernant la prévention des ICD, des stratégies vaccinales sont actuellement en cours d'élaboration. Des vaccins contre les toxines de *C. difficile*, en cours de phase 2 et 3 d'essais cliniques, protègent contre l'effet toxique sur l'épithélium intestinal et les signes cliniques associés (190,191). Malheureusement, Sanofi a arrêté récemment le développement de ces vaccins probablement à cause d'une faible efficacité. D'autres approches vaccinales ciblant les facteurs de colonisation de *C. difficile* ont été également étudiées, et ont montré une protection partielle contre la maladie (192–194).

I.6.3. La place des immunomodulateurs dans le traitement des ICD

La réponse immunitaire innée représente le premier mécanisme de défense de l'hôte contre *C. difficile*. Cependant, une réponse inflammatoire excessive semble être à l'origine des manifestations cliniques observées et des formes sévères de l'infection (195). Ainsi, les colites simples ou les colites pseudomembraneuses sont caractérisées par des infiltrats inflammatoires constitués de débris cellulaires nécrotiques, de fibrine, de mucus, de neutrophiles et d'autres cellules infiltrées de la circulation périphérique (Figure 8) (196,197). Il pourrait alors être envisageable d'utiliser des immunomodulateurs pour contrôler la réponse inflammatoire, principalement responsable des lésions sévères liés aux ICD. Or l'utilisation de corticoïdes ou d'autres biothérapies pourrait être controversée dans le traitement de l'ICD, et au contraire, elle pourrait contribuer à la sévérité de l'infection (198). Les corticostéroïdes sont des immunosuppresseurs non spécifiques qui pourraient exercer leur action de déplétion des lymphocytes en bloquant l'expression des récepteurs de cytokines sur les cellules T et les cellules présentatrices d'antigène, empêchant ainsi l'activation de ces cellules et diminuant la production des cytokines pro-inflammatoires (199). De fortes doses de corticostéroïdes peuvent provoquer une immunosuppression et compromettre la capacité de résister aux infections (200).

Une seule étude a montré que l'utilisation de corticostéroïdes par voie IV durant le traitement de la maladie pulmonaire obstructive chronique a été associée à une réduction de l'incidence d'ICD chez les patients testés. Cependant, il n'a pas été rapporté de données sur les doses de corticoïdes, les taux de récurrences et la sévérité des maladies. De plus, la taille de l'étude a été jugée par les auteurs comme étant relativement petite (201). Dans un rapport de cas en 2003, un patient âgé de 5 ans a développé une ICD sévère suite à une hospitalisation. Après 14 jours de traitement antibiotique sans succès, il a été traité par du méthylprednisolone en IV, qui a permis l'arrêt de la diarrhée 24 h après le début de ce traitement, qui a été poursuivi pour une durée d'un mois. L'enfant a cependant développé des effets secondaires de la corticothérapie au long cours (facies lunaire) (202).

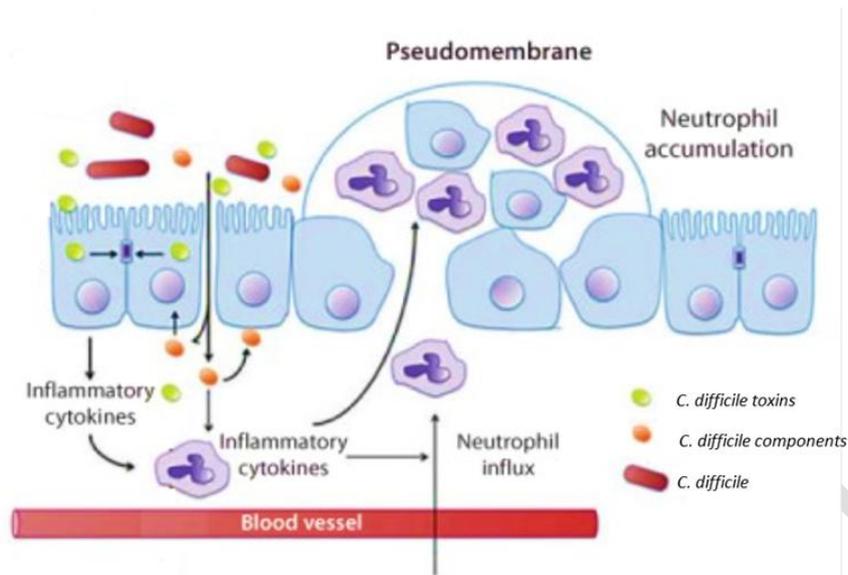


Figure 8. Formation des pseudomembranes intestinales induites par *Clostridium difficile*. Les toxines produites par la bactérie et d'autres produits bactériens dont les monomères de flagelline, interagissent avec les cellules épithéliales intestinales et induisent la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires qui attirent à leur tour des polynucléaires neutrophiles et d'autres cellules immunitaires infiltrées de la circulation périphérique. L'accumulation de ces cellules avec des débris cellulaires nécrotiques, de la fibrine et du mucus, conduit à la formation de pseudomembranes modifiée d'après (197).

En revanche, d'autres études déconseillent l'utilisation de corticoïdes dans le traitement des ICD. Dans une étude menée aux États-Unis, entre 2004 et 2008, sur 2024 patients, la mortalité des patients atteints d'ICD sous traitement par corticoïdes a été significativement supérieure à celle des patients non traités (19,3 % vs 9,6 %). En outre, les patients atteints d'ICD et ayant reçu un traitement par corticoïdes présentent un risque de mortalité à court-terme supérieur à celui des patients du groupe contrôle(203). Dans une autre étude en 2011, l'impact des immunosuppresseurs a été étudié *in vivo* dans un modèle murin de rechute. Un groupe de souris a été traité par la dexaméthasone après un premier épisode de l'infection. Après la deuxième infection des animaux avec des spores de *C. difficile*, toutes les souris de ce groupe ont développé des diarrhées sévères et sont toutes décédées (100 % de mortalité), alors que les souris infectées et non traitées à la dexaméthasone ont développé des diarrhées moins sévères avec 40 % de mortalité, ce qui suggère que les souris traitées par le corticoïde sont plus susceptibles aux formes sévères de l'infection (204). Pour comprendre le mécanisme par lequel les corticostéroïdes augmentent la sévérité des ICD, Kim HB et al ont étudié en 2016 l'effet *in vivo* de la dexaméthasone sur le microbiote intestinal sur un modèle murin d'ICD. La mortalité des souris infectées par *C. difficile* et traitées par des antibiotiques seuls a été inférieure à celle des souris infectées et traitées par des antibiotiques et la dexaméthasone. L'analyse du microbiome fécal, par

séquençage de la région hypervariable V1-V2 des gènes des ARNs 16S, a montré que les profils de l'altération du microbiote intestinal entre les deux groupes étaient similaires, mais que le microbiote des souris traitées aux antibiotiques et à la dexaméthasone a pris plus de temps à se rétablir par rapport aux souris traitées aux antibiotiques seuls. Ces données suggèrent donc que les corticoïdes retardent la récupération des populations bactériennes du microbiote intestinal altéré par les antibiotiques et augmentent ainsi la sévérité de la maladie (205). Une étude récente sur des patients âgés vivant en maisons de retraite atteints d'ICD a montré que le risque de rechutes est 5,9 fois plus élevé chez les patients traités par des corticoïdes (206).

Les corticostéroïdes sont alors non seulement considérés comme un facteur aggravant la sévérité des ICD mais également un facteur de risque favorisant l'initiation de l'infection (207–209). Ainsi, le développement d'autres approches thérapeutiques ciblant plus spécifiquement l'inflammation, principal facteur responsable du tableau clinique des ICD, s'avère nécessaire et pourrait contribuer à la diminution de la morbi-mortalité et des coûts élevés liés aux ICD.

II. Pathogénicité de *Clostridium difficile*

C. difficile se transmet par la voie fécale-orale (Figure 9). Les spores sont des cellules dormantes hautement résistantes aux conditions environnementales y compris aux désinfectants et aux nombreux antibiotiques (voir section 1,6,1,1, Résistance de *C. difficile* aux antibiotiques) (210). Les spores représentent les formes contaminantes puisque les cellules végétatives sont anaérobies strictes et donc incapables de survivre à l'extérieur de l'hôte ou dans l'environnement acide de l'estomac (211). La germination des spores est activée par la reconnaissance des acides biliaires primaires dont le taurocholate par le récepteur CspC, déclenchant ainsi une cascade protéolytique conduisant à la dégradation du peptidoglycane de la spore, la libération du calcium dipicolinique et la réhydratation de la spore aboutissant enfin à la croissance des formes végétatives (212,213).

La germination des spores et le développement des formes végétatives sont directement influencés par le microbiote intestinal de l'hôte et les métabolites associés. Ainsi, suite à une antibiothérapie, la perturbation du microbiote va lever l'inhibition de la germination et la compétition de la colonisation par d'autres bactéries et va donc permettre à *C. difficile* de s'établir dans une niche convenable à son développement et sa croissance (212,214,215).

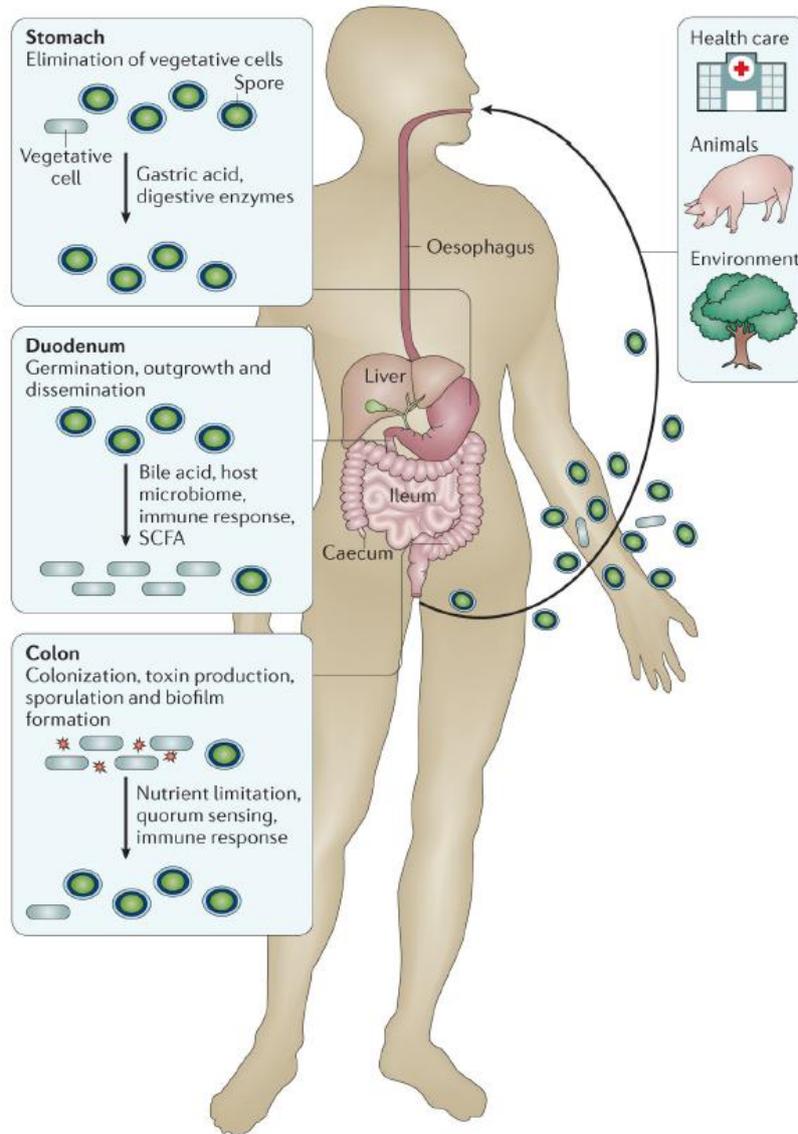


Figure 9. Stades du cycle de vie de *Clostridium difficile* dans l'environnement et le tractus gastro-intestinal humain. Trois sources d'infection (environnement lié aux soins de santé, animaux et environnement) sont indiquées. Une série de facteurs de l'hôte influencent le cycle de vie de *Clostridium difficile*, ainsi que le nombre relatif de spores et de cellules végétatives (métaboliquement actives) dans l'intestin. Le passage dans l'estomac élimine la plupart des cellules végétatives. Cependant, les spores survivent, germent et se développent dans le duodénum. Dans le caecum et le côlon, *C. difficile* commence à produire des spores à nouveau, et les cellules végétatives sont excrétées par le patient pendant l'infection. La toxine est produite dans le côlon. *C. difficile* étant une bactérie anaérobie stricte, la transmission se fait principalement par les spores. SCFA, acide gras à chaîne courte (comme le butyrate) (2).

Des enzymes mucolytiques dont la *cell wall protein 84 (Cwp84)* sont sécrétées par la bactérie et pourraient dégrader le mucus, ainsi les protéines de la surface bactérienne contribuent activement à l'adhésion aux tissus de l'hôte et à la colonisation digestive par *C. difficile* (14). En effet, ces phénomènes sont considérés comme des prérequis à l'infection et aux lésions intestinales : *C. difficile* doit franchir la barrière de mucus, s'implanter et coloniser les cellules épithéliales et permettre ainsi aux toxines d'atteindre leurs cibles cellulaires. Parmi ces facteurs de colonisation, on retrouve la protéase Cwp84 et des facteurs d'adhésion comme les protéines de la couche S (couche cristalline à la surface de la bactérie), l'adhésine Cwp66, la protéine de liaison à la

fibronectine Fbp68, la protéine de choc thermique GroEL ou encore les flagelles (Voir section II.2. Colonisation). Ainsi, l'inhibition ou la délétion de chacune de ces protéines diminue le niveau de la colonisation, suggérant que la colonisation par *C. difficile* est multifactorielle (14,216–220).

Les facteurs majeurs de virulence de *C. difficile* sont les toxines TcdA et TcdB. Ces toxines se lient à leur récepteur à la surface des cellules épithéliales intestinales et induisent une réponse délétère en perturbant le cytosquelette d'actine et en provoquant la rupture de la barrière épithéliale intestinale, la libération des cytokines pro-inflammatoires et le recrutement des cellules immunitaires (221). Certaines souches de *C. difficile* expriment une autre toxine appelée toxine binaire ou CDT (*Clostridium difficile* toxin), dotée d'une activité d'ADP-ribosylation spécifique de l'actine provoquant la dépolymérisation de celle-ci, l'altération du cytosquelette et la mort cellulaire (222).

La reconnaissance des déterminants de pathogénicité de *C. difficile* est médiée par les récepteurs de l'immunité innée, les *Toll-like receptor* (TLR) et les *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors* (NOD). Par exemple, la protéine SlpA (Voir section II.2.2. Facteurs de colonisation) est reconnue par le récepteur TLR4, la flagelline interagit avec le récepteur TLR5, et NOD1 est probablement activé par les composants dérivés du peptidoglycane bactérien (223–225). Les cellules intestinales de l'hôte vont agir à leur tour en produisant des composants antimicrobiens dont le lysozyme et des peptides cationiques antibactériens, comme première ligne de défense (226,227). D'autre part, la résistance de la bactérie à ces composants de l'hôte est multifactorielle et médiée par certains mécanismes comme par exemple la modulation de la charge de la paroi et la production des protéases dont la PrsW ou des protéines codées par le locus *cpr* (228–231). Les principaux facteurs et mécanismes de virulence de *C. difficile* seront développés plus loin dans ce chapitre.

II.1. La sporulation de *C. difficile*

II.1.1. Composition de la spore

Le noyau de la spore, contenant le chromosome bactérien et des amas de ribosomes et de complexes nucléoprotéiques, est recouvert par trois couches protectrices : le cortex (couche interne) formé principalement de peptidoglycane, la paroi sporale dense (*coat*), composée majoritairement de protéines, et l'exosporium (couche externe) principalement constitué de glycoprotéines (Figure 10) (210). La caractérisation des spores de *B. subtilis* a grandement contribué à celle des spores de *C. difficile*. Néanmoins, seulement 25 % des plus de 70 protéines

qui composent la paroi de la spore sont conservées entre *B. subtilis* et *C. difficile* (232). Parmi les protéines de la paroi de la spore les mieux caractérisées on retrouve les protéines Cot (cotA, cotB, cotCB, cotD, et cotE) avec une activité catalase, la protéine SodA dotée d'une activité superoxyde dismutase, la protéine CspC composant essentiel du système de détection des acides biliaires et de déclenchement de la germination et enfin la protéine CdeC riche en cystéine et placée à proximité de l'exosporium, jouant un rôle dans la résistance à la chaleur, au lysozyme et à l'éthanol (233–235). L'exosporium de *C. difficile* contient trois glycoprotéines de type collagène, BclA1, BclA2 et BclA3, qui sont conservées avec l'exosporium de *Bacillus anthracis* (236). Ces protéines sont responsables de l'interaction entre la spore et la matrice extracellulaire, la régulation de la germination, le contrôle de l'hydrophobicité de la spore et l'interaction avec l'épithélium (237,238).

II.1.2. Formation de la spore

En culture, la sporulation de *C. difficile* se produit en phase stationnaire lorsque les nutriments s'appauvrissent. À un pôle d'une cellule végétative de *C. difficile*, un septum est créé, ce qui entraîne une division asymétrique et la création de deux compartiments de taille inégale (239). Le compartiment le plus petit - la partie antérieure - se développera dans la spore, tandis que le compartiment plus grand - la cellule mère - préparera l'autre compartiment à la dormance. La partie antérieure se transforme en un récipient de stockage des chromosomes desséché et résistant au stress, qui sera libéré dans l'environnement par lyse de la cellule mère. Les spores peuvent germer et produire de nouvelles cellules végétatives lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables (Figure 10).

Les signaux environnementaux déclenchant la sporulation ne sont pas bien connus alors que le mécanisme moléculaire permettant la formation de la spore a été bien décrit. Ainsi, plus de 404 gènes sont impliqués dans la sporulation (240).

Chez *C. difficile*, la sporulation est initiée par une signalisation liée à des histidine kinases (CD1352, CD1492, CD1579, CD1949 et CD2492 chez la souche 630) qui vont aboutir à la phosphorylation et à l'activation du facteur de transcription Spo0A (241,242). Une fois activé, Spo0A va contrôler le réseau de régulateurs de la sporulation en régulant d'une manière directe une douzaine de gènes (243). Les mutants qui ne possèdent pas le gène codant Spo0A sont incapables de sporuler et leur dissémination à partir de souris infectées vers des souris non-infectées est fortement réduite (211). L'expression de Spo0A est également contrôlée par deux facteurs de transcription, CodY et CcpA, qui peuvent intégrer des informations sur l'état nutritionnel dans le déclenchement de la formation des spores. Ce sont des répresseurs qui se lient à l'ADN en présence de GTP et des

nutriments (acides aminés à chaînes ramifiées par exemple) et inhibent la transcription de nombreux gènes y compris celui codant SpoA lui-même (244,245). De plus, la suppression des oligopeptides perméases Opp et App diminue la capacité de la bactérie à recueillir les nutriments des peptides dans l'environnement local, ce qui entraîne la famine des cellules et accélère la transition vers la phase stationnaire (239). Prises ensemble, ces données suggèrent que *C. difficile* réprime la sporulation en présence de nutriments.

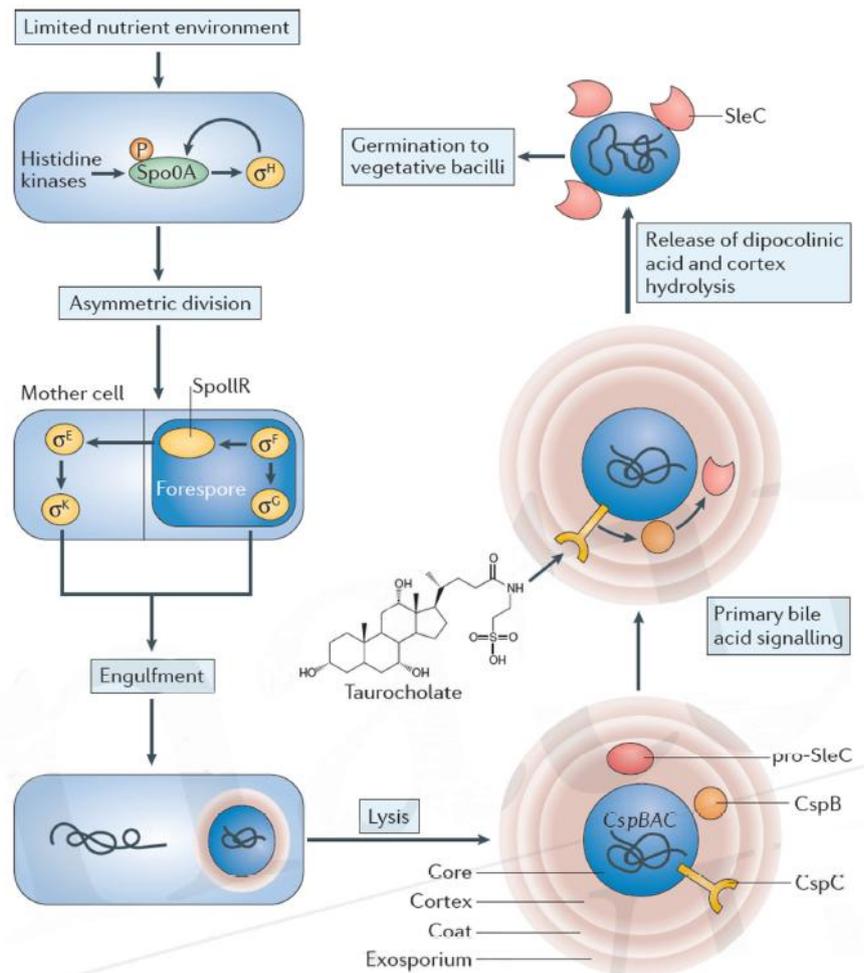


Figure 10. Sporulation et germination de *C. difficile*. Un environnement nutritif limité induit la sporulation. Le facteur de transcription *stage 0 sporulation protein A* (Spo0A) est phosphorylé par des histidines kinases, activant ainsi une cascade d'événements de signalisation et morphologiques qui créent un espace dans la cellule mère de la bactérie. Après la lyse de cette cellule mère, les spores sont libérées dans l'environnement. Le noyau de la spore, qui contient le chromosome condensé, est encapsulé par trois couches protectrices : le cortex, la paroi (*coat*) et l'exosporium. La germination des spores peut être initiée par les acides biliaires, tels que le taurocholate, qui signalent via le récepteur CspC. L'activation de l'enzyme SleC par CspB conduit à la dégradation du cortex de la spore et enfin à la croissance d'une nouvelle cellule végétative (239).

En aval de Spo0A, on trouve un programme de transcription piloté par l'activation séquentielle de quatre facteurs sigma d'ARN polymérases spécifiques de différents compartiments : σ^F , σ^E , σ^G et

σ K (246). σ F n'est activé que dans la zone antérieure, ce qui entraîne la production de la protéine de signalisation SpoIIR et l'activation subséquente de σ E dans la cellule mère (247). La délétion individuelle des facteurs sigma, a démontré que σ F induit l'activation de σ G dans le compartiment antérieur, tandis que σ E favorise l'activité de σ K dans la cellule mère. Cependant, contrairement à *B. subtilis*, l'activité de σ G ne dépend pas de σ E et σ K est indépendant de σ G, ce qui suggère que la signalisation inter-compartmentée pour l'activation des facteurs sigma n'est pas conservée chez *C. difficile* (248).

II.1.3. Germination de la spore

II.1.3.1. Induction de la germination

Plusieurs facteurs sont impliqués dans l'induction de la germination (Figure 10). Comme déjà indiqué, l'utilisation antérieure d'antibiotiques représente le facteur de risque majeur des ICD. La dysbiose intestinale pourrait significativement influencer la structure et la fonction du microbiote résident. La modification de la composition du microbiote intestinal entraîne une diminution de la résistance à la colonisation favorisant ainsi la germination de *C. difficile*, sa croissance et sa dissémination dans l'intestin (249,250). En effet, plusieurs études ont montré une diminution de la diversité des espèces et de la composition du microbiote intestinal chez les patients atteints d'ICD. Le microbiote de ces patients montre une augmentation des Firmicutes et des Proteobactéries et une diminution des Bacteroidetes par rapport à celui des patients sains. En outre, les *Ruminococcaceae*, les *Lachnospiraceae*, les *Bacteriodaceae* et les *Clostridia* cluster IV et XIVa sont diminués tandis qu'une augmentation de l'abondance des *Enterococaceae* pourrait être observée (87,251,252). Il a été ainsi montré que la co-colonisation par des taxons bactériens protecteurs, dont *Clostridium* ou *Eubacterium*, pourrait protéger contre le développement de l'ICD à partir d'un portage asymptomatique (253).

Le rôle exact du microbiote intestinal dans la prévention de la germination et le développement de *C. difficile* n'est pas complètement élucidé. Cependant, il a été montré que, d'une part, la perte des acides biliaires secondaires dans le caecum et le côlon suite à une antibiothérapie est fortement associée à la susceptibilité de développer une ICD, et d'autre part, le rétablissement ou la guérison après la reconstitution du microbiote intestinal par une TMF sont hautement corrélés aux niveaux des acides biliaires secondaires (254). Les acides biliaires sont produits dans le foie et sécrétés dans l'intestin grêle, puis réabsorbés au niveau de l'iléon terminal. Toutefois, environ 5 % des acides biliaires passent dans le gros intestin où ils seront convertis par les bactéries anaérobies du côlon en acides biliaires secondaires (Figure 11) (255).

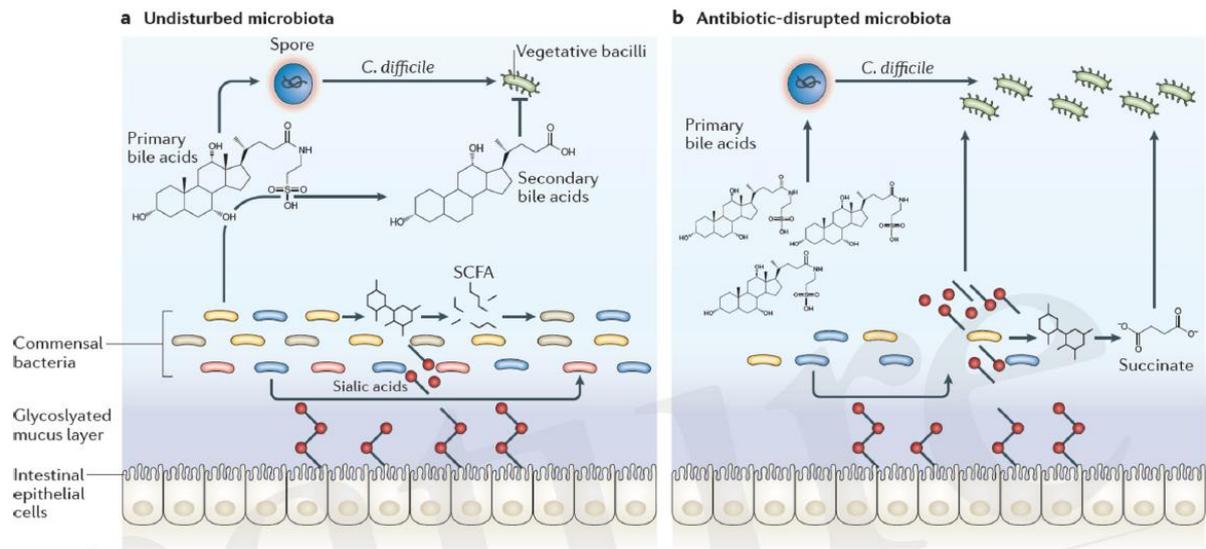


Figure 11. Rôle du microbiote intestinal dans l'inhibition du développement de *C. difficile*. a. Le microbiote intact convertit les acides biliaries primaires en acides biliaries secondaires, dont plusieurs dérivés inhibent la croissance de *Clostridium difficile* par l'action détergente sur les cellules végétatives. Les bactéries commensales qui expriment les sialidases clivent les sucres attachés aux cellules épithéliales et libèrent l'acide sialique dans la lumière intestinale. L'activité fermentative des espèces bactériennes commensales transforme les glucides en acides gras à chaîne courte (SCFA), tels que le succinate. Les populations bactériennes commensales peuvent consommer ces métabolites en tant que sources d'énergie. b. La perturbation du microbiote par les antibiotiques appauvrit ce microbiote en convertisseurs d'acides biliaries primaires, ce qui permet la sporulation et la croissance de *C. difficile*. Les antibiotiques peuvent également épuiser les consommateurs d'acide sialique et de succinate en concurrence, libérant une source d'énergie pour le *C. difficile* (239).

Les acides biliaries primaires dont le glycocholate et le taurocholate sont déconjugués par des hydrolases salines exprimées à la surface de nombreuses espèces bactériennes intestinales, pour produire des acides choliques qui seront à leur tour désyhydroxylés en désoxycholate ou lithocholate, par d'autres espèces bactériennes au niveau du côlon (notamment *Clostridium scindens*) (255,256). Les acides biliaries secondaires sont ainsi capables d'inhiber la germination des spores et le développement des formes végétatives de *C. difficile*. En revanche, les acides biliaries primaires ont un effet inverse. Il a été montré que l'addition du taurocholate au milieu de culture augmente la croissance des colonies à partir des spores de *Clostridium* isolées des selles des patients (239). D'autres études ont ultérieurement montré que l'addition du taurocholate au milieu CCFA, utilisé pour la culture de *C. difficile*, augmente la récupération des colonies à partir des spores (257). D'une manière importante, tous les acides biliaries ne possèdent pas le même rôle dans l'induction de la germination. Par exemple, le taurocholate et la glycine vont favoriser ensemble la germination des spores de *C. difficile* alors que l'acide chénodésoxycholique, un autre

acide biliaire primaire, inhibe la germination des spores et la croissance des formes végétatives dans le milieu de culture liquide (258,259). Ces observations suggèrent alors que la production d'acides biliaires secondaires par les bactéries commensales du microbiote, et la diminution indirecte de ces acides biliaires par le traitement antibiotique, affecte la susceptibilité au développement de l'ICD.

II.1.3.2. Dégradation du cortex de la spore

La germination induite par certains acides biliaires primaires conduit à la dégradation du cortex, à la libération du calcium et de l'acide dipicolinique et à la réhydratation de la spore, qui sont des étapes précoces importantes dans le processus de germination (Figure 10) (260,261). Le récepteur des acides biliaires sur les spores de *C. difficile*, CspC, a été récemment identifié. La protéine CspC est codée par le locus *cspBAC* et est similaire en séquence à celui codant les protéases de la famille des subtilisines chez *Clostridium perfringens*, lesquelles ont été associées à l'activation de SleC, une enzyme lytique essentielle à la germination des spores (235). La délétion de CspC rend les spores de *C. difficile* insensibles au taurocholate. Une seule substitution d'acide aminé de la glycine en arginine au résidu 457 de CspC modifie l'effet inhibiteur de la germination du chénodésoxycholate en un effet stimulant la germination, soutenant de manière significative la notion que CspC s'associe directement aux acides biliaires primaires (235). CspB-CspA est une protéine hybride codée également par le locus *cspBAC*. Elle est clivée par une protéase nommée YabG pendant la sporulation libérant CspB et pro-SleC qui deviennent des composants de la paroi de la spore (262,263). L'interaction du taurocholate avec le récepteur CspC active la protéine CspB qui, par son activité enzymatique protéolytique, va cliver la pro-SleC en SleC mature qui dégrade le peptidoglycane dense du cortex pendant la germination des spores (Figure 10) (264).

La protéine CspA possède un domaine pseudoprotéase qui va réguler le niveau du récepteur CspC dans la spore (263). Une fois amorcée, la germination des spores de *C. difficile* est un processus complexe qui implique la régulation positive ou négative de plus de 500 gènes (265). L'efficacité de la germination varie entre les souches cliniques de *C. difficile*, et l'éventuelle corrélation entre les propriétés de germination et la virulence de la bactérie reste un domaine d'investigation très actif (266,267).

II.2. Colonisation du côlon par *C. difficile*

L'étape de colonisation est définie par le développement des bactéries dans l'environnement colique et implique plusieurs mécanismes, dont l'évasion de l'immunité innée de l'hôte, l'adhésion

à la muqueuse intestinale et la multiplication des cellules végétatives, souvent médiés par un ensemble de protéines exprimées à la surface de *C. difficile* interagissant avec l'hôte.

II.2.1. Résistance aux défenses innées de l'hôte

Les bactéries pathogènes colonisant les muqueuses ont acquis une résistance aux agents antimicrobiens abondants au niveau de ces sites. Par exemple, le lysozyme est une enzyme antimicrobienne sécrétée en grande quantité par les cellules épithéliales. C'est une peptidoglycane hydrolase qui clive la liaison β (1-4) entre MurNAc (*N-Acetylmuramic acid*) et GlcNAc (*N-Acetylglucosamine*) de la structure du peptidoglycane. La modification du peptidoglycane, principalement par la N-désacétylation du GlcNAc représente le mécanisme de résistance direct contre le lysozyme (268). *C. difficile* est naturellement hautement résistant au lysozyme grâce au taux élevé de désacétylation de son peptidoglycane (269). La désacétylation est induite également par des concentrations sub-inhibitrices de lysozyme, augmentant ainsi la résistance à cet agent. En effet, le lysozyme augmente l'expression du facteur σ^V extracytoplasmique, qui va réguler à son tour la désacétylase PdaV (CD630_15560) principalement responsable de la désacétylation chez *C. difficile* (270). D'autres agents antimicrobiens sont également sécrétés par les cellules épithéliales et les bactéries commensales, dont les peptides cationiques antimicrobiens (CAMPs) qui possèdent une charge positive facilitant leur interaction avec la membrane bactérienne chargée négativement. Il a été montré que plusieurs défensines et cathélicidines sont capables de tuer efficacement les formes végétatives de *C. difficile*. Il est à remarquer que la souche 027 possède une résistance élevée à la cathélicidine LL-37 alors qu'elle est plus sensible aux défensines que les autres souches (228,271). *C. difficile* résiste à ces CAMPs par plusieurs mécanismes dont la D-alanyl estérification des acides téichoïques, ce qui conduit à l'augmentation de la charge positive de la surface bactérienne réduisant ainsi l'efficacité des CAMPs (272). Cette modification est codée par l'opéron *dlt* qui est lui-même induit par des concentrations subinhibitrices de plusieurs CAMPs (231). D'autres mécanismes qui impliquent des transporteurs ABC contribuent également à la résistance de la bactérie aux CAMPs, et pourraient être impliqués dans l'étape de colonisation et de la production des toxines par *C. difficile* (226,227).

II.2.2. Facteurs de colonisation

II.2.2.1. Adhésines

L'adhésion de *C. difficile* aux cellules de l'hôte fait intervenir des adhésines bactériennes qui sont essentiellement des protéines de surface. Plusieurs adhésines de *C. difficile* ont été caractérisées, bien que leur rôle dans la pathogenèse des ICD ne soit pas encore complètement élucidé.

La couche S ou *S-layer* est une couche de protéines exposée à la surface et produite par de nombreuses bactéries. Les couches S se composent généralement de sous-unités de monomères glycoprotéiques identiques qui forment un réseau cristallin régulier à deux dimensions visible par microscopie électronique (273). Les fonctions de la couche S varient entre espèces bactériennes et comprennent des rôles tels que la protection contre les phages, l'adhérence et la résistance au complément (273).

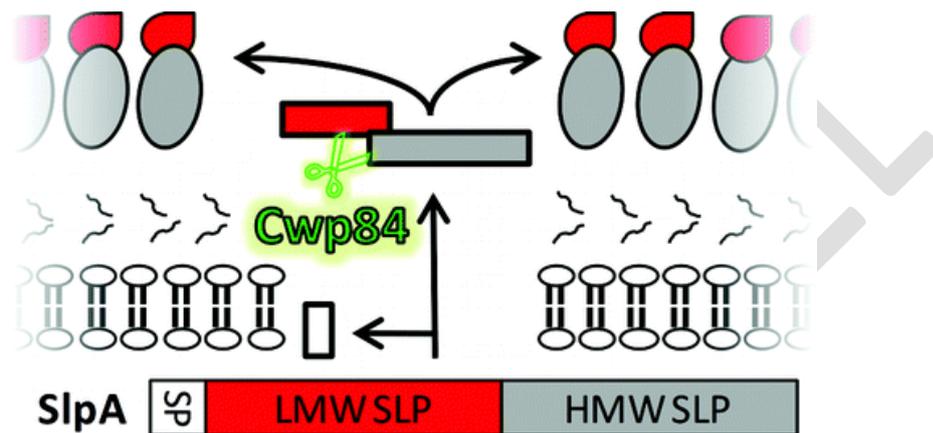


Figure 12. Maturation des protéines de la couche S de *C. difficile*. La couche S se forme à partir d'un processus en trois étapes : 1) le peptide signal (SP) du précurseur SlpA est clivé, 2) la protéase Cwp84 coupe au sein du précurseur pour générer les deux sous-unités LMW-SLP et HMW-SLP, 3) LMW-SLP et HMW-SLP se réassocient à la surface bactérienne afin de former la couche S (274).

La couche S forme la couche la plus externe de la bactérie, ce qui lui confère un potentiel immunogénique important. Les protéines de la couche S, ou S-layer proteins (SLP), ont été détectées dans toutes les souches de *C. difficile*. Contrairement à la plupart des bactéries, où la couche S est composée d'une espèce protéique singulière, la couche S de *C. difficile* consiste en deux sous-unités protéiques appelées *High-Molecular Weight-Surface Layer Protein* (HMW-SLP) constituée d'une protéine de poids moléculaire élevé (47 kDa) et *Low-Molecular Weight-Surface Layer Protein* (LMW-SLP) constituée d'une protéine de faible poids moléculaire (36 kDa). Ces formes sont dérivées du précurseur polypeptidique SlpA, codé par le gène *slpA*, qui subit un clivage protéolytique par la protéase Cwp84 (Figure 12) (274,275). Les protéines HMW-SLP sont hautement conservées parmi les souches de *C. difficile* tandis que les protéines LMW-SLP sont variables (276). Les sous-unités HMW et LMW forment un complexe non-covalent étroitement associé, jouant un rôle dans l'adhésion aux cellules hôtes, mis en évidence par l'adhérence aux cellules *in vitro* et sur des coupes de tissu gastro-intestinal humain (217,277). En outre, il a été

décrit que des anticorps contre SlpA sont capables de bloquer l'adhérence de *C. difficile* aux cellules cultivées (217,278). L'adhésion de *C. difficile* aux cellules épithéliales est considérablement réduite sur les monocouches pré-incubées avec les protéines de la couche S ou la SlpA purifiée (protéine native et recombinante) (278).

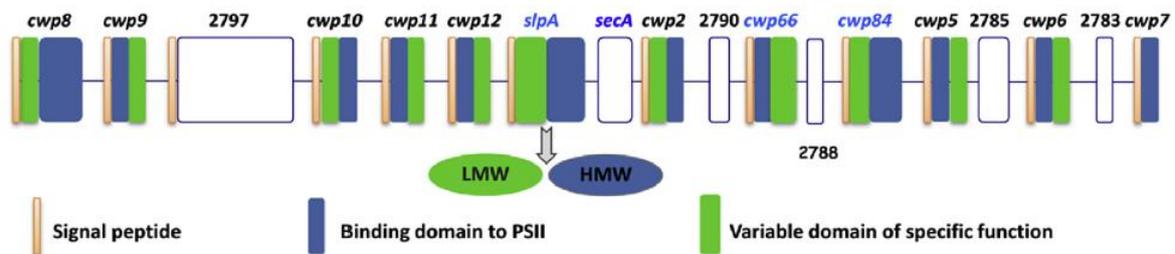


Figure 13. Locus représentant les gènes qui codent les protéines Cwp de surface de *C. difficile*. Le cluster de gènes "clostridial wall proteins (*cwp*)" porte 18 cadres ouverts de lecture (ORFs) parmi lesquels 12 codent des protéines avec un peptide signal, un domaine de liaison conservé à la surface bactérienne (situé dans la partie N ou C-terminale de la protéine) et un domaine variant entre les paralogues responsables d'une fonction spécifique. Le domaine C-terminal de Cwp66 affiche des propriétés adhésives; le domaine N-terminal de Cwp84 présente des propriétés protéolytiques (275).

Les protéines SLP sont les mieux caractérisées de la famille des protéines de la paroi de *C. difficile* appelées *cell wall proteins* (CWPs). Cette famille de CWP est constituée de 29 paralogues de la protéine HMW identifiés dans la souche 630 par analyse bio-informatique (279). Collectivement, ces protéines possèdent 2 à 3 domaines de liaison à la paroi conservés responsables de l'ancrage de la protéine à la surface externe de la bactérie avec un domaine unique qui peut déterminer la fonction (280). Douze des gènes codant les CWPs sont regroupés dans le locus *cwp* (> 63 kb) (Figure 13) (281). L'analyse bioinformatique récente de ce locus dans 57 isolats cliniques de *C. difficile* montre une grande variabilité entre les souches. Cette variation antigénique rend les stratégies de vaccination contre cette région plus difficiles (282). Les 17 locus *cwp* restants sont répartis dans le génome de *C. difficile*. L'analyse bioinformatique de 40 isolats cliniques de *C. difficile* indique que les locus *cwp* restants peuvent être divisés en 2 groupes: le premier composé de 9 loci *cwp* hautement conservés à la fois dans et entre les ribotypes, et le deuxième groupe plus variable (283). Les analyses transcriptomiques et protéomiques ont montré qu'un certain nombre de ces gènes et protéines sont exprimés *in vitro* (280,284). De plus, l'analyse du sérum de patients a détecté des anticorps contre un certain nombre de protéines de la paroi cellulaire, en plus de la HMW et LMW-SLP. Cette analyse suggère que ces CPWs sont exprimées *in vivo* et sont reconnues par le système immunitaire, servant de cibles thérapeutiques potentielles (285).

Une autre protéine bien caractérisée de la paroi cellulaire de *C. difficile* est la protéine Cwp84 (84 kDa), une cystéine protéase impliquée dans la maturation de la couche S (286). Il a également été montré que la protéine Cwp84 dégrade les protéines de la matrice extracellulaire *in vitro*, ce qui suggère que cette protéine peut jouer un rôle dans la dégradation des tissus et la dissémination bactérienne durant l'infection (216). Cette protéine possède, comme la majorité des Cwp, une structure en trois domaines : un peptide signal, un domaine N-terminal qui présente une activité catalytique et un domaine C-terminal homologue au domaine d'ancrage de Cwp66 (287). Deux formes de cette protéase sont associées à la bactérie : une forme à 80 kDa, et sa forme mature et clivée à 47 kDa, dont chacune peut présenter une activité protéolytique différente et avoir des rôles différents *in vivo* dans le processus infectieux (288). Une protéine homologue de Cwp84, Cwp13, a également été caractérisée. Elle joue un rôle dans la maturation de Cwp84 mais présente une faible activité envers SlpA, et n'est pas considéré comme essentiel pour l'activité Cwp84 ou la maturation de la protéine Slp (286). La protéase Cwp84 est capable de cliver ou dégrader *in vitro* certaines protéines de la matrice extracellulaire de l'hôte, telles que la fibronectine, la vitronectine et la laminine (216,288). Cependant, le rôle de Cwp84 dans la progression de la maladie est probablement limité, puisqu'une souche mutée dans le gène *cwp84*, et donc dépourvue de la protéine Cwp84, est également virulente que la souche sauvage dans le modèle hamster [202].

Une autre protéine de surface cellulaire impliquée dans l'adhésion est Cwp66 (66 kDa) qui abrite 2 domaines, chacun avec 3 répétitions imparfaites, et un domaine additionnel homologue à l'autolysine de *B. subtilis*, CwlB (218). Cette protéine a été détectée à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines de surface de bactéries ayant subi un choc thermique, suggérant que Cwp66 est une protéine de choc thermique associée à la surface. L'adhésion de *C. difficile* ayant subi un choc thermique à des cellules cultivées *in vitro* s'est avéré être réduite en présence d'anticorps dirigés contre les extrémités N et C-terminales de Cwp66, alors que l'adhésion des cellules non traitées par la chaleur n'a pas été affectée. Cela suggère que le choc thermique est important dans la fonction d'adhésion de Cwp66 et indique que d'autres protéines de surface de *C. difficile* sont impliquées dans l'adhésion aux cellules *in vivo*.

La plus grande protéine caractérisée des protéines de la paroi cellulaire de la souche 630 de *C. difficile*, CwpV (167 kDa), a une expression variable selon la phase de croissance (289). Cette protéine n'est exprimée que par 5 % des bactéries dans les conditions de croissance standard de laboratoire. La région C-terminale de cette protéine avec des séquences répétées est très variable entre les souches de *C. difficile*, avec 5 types de répétition antigéniquement distincts (290). Il est suggéré que CwpV est post-traductionnellement clivée en 2 fragments qui se réassocient pour former un complexe stable, mais associé de manière non covalente (289,290). Les études

proposent que CwpV favorise l'agrégation des bactéries via le domaine C-terminal répétitif, indiquant un rôle potentiel pour la protéine dans l'interaction bactérienne et la formation de biofilm dans l'intestin de l'hôte (290). Il a été récemment montré que ce domaine C-terminal de CwpV pourrait également fournir à *C. difficile* une protection antiphagique à large spectre ; cette hypothèse est justifiée par la résistance d'une souche 027 aux phages après la surexpression de CwpV modifiée génétiquement [219].

II.2.2.2. Protéines de liaison à la matrice extracellulaire

C. difficile se lie à des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) telles que la fibronectine, le fibrinogène, le collagène et la vitronectine (291). La fibronectine est une glycoprotéine de masse moléculaire élevée de la MEC de l'hôte jouant un rôle important dans l'adhésion de nombreux agents pathogènes bactériens. *C. difficile* possède une protéine de liaison à la fibronectine de 68 kDa (*Fibronectin binding protein 68*), annotée FbpA dans la souche 630, dont le gène semble être hautement conservé entre les isolats de *C. difficile* (219). Fbp68 est une protéine de liaison au manganèse, nécessitant ce métal pour la stabilité structurelle et la liaison à la fibronectine (292). Comme pour de nombreux facteurs de virulence de *C. difficile*, le rôle de la protéine de liaison de la fibronectine dans la pathogenèse de la bactérie n'est pas complètement élucidé. Il a été montré que la protéine Fbp68 est capable de se lier aux constituants de la matrice extracellulaire, y compris la fibronectine, le fibrinogène et la vitronectine, et les anticorps contre Fbp68 inhibent partiellement la liaison de cette protéine aux cellules *in vitro* (219).

Par exemple, il a été montré que le mutant *fbpA* est excrété dans les fèces au même niveau que la souche sauvage dans des souris monoxéniques, mais avec une colonisation réduite de l'épithélium caecal (293). De même, aucune différence dans l'implantation intestinale et la colonisation caecale était observée entre la souche sauvage et le mutant *fbpA* chez des souris dixéniques et également chez des souris avec un microbiote humain (293).

Une étude récente a identifié une nouvelle métalloprotéase, Zmpl, présentant une similitude de séquence avec le facteur létal de *B. anthracis*, également capable de dégrader les protéines de la matrice extracellulaire, en particulier le fibrinogène et la fibronectine (294). Cette propriété de dégradation de la MEC pourrait améliorer le caractère envahissant et la propagation de *C. difficile* dans l'hôte infecté, comme cela a été démontré pour d'autres agents pathogènes (295).

Une protéine de liaison au collagène, *Collagen binding protein A* (CbpA), a été récemment identifiée. Cette protéine de haut poids moléculaire (environ 118 kDa) associée à la surface bactérienne, possède un domaine N-terminal de liaison au collagène. Un motif peptidique SPKTG

est présent à son domaine C-terminal et pourrait donc permettre l'ancrage à la surface bactérienne grâce à la sortase B (296). Cette protéine est capable de se lier aux collagènes I et V, les plus communs des type de collagène retrouvés dans de nombreux tissus y compris l'intestin (297). Des recherches supplémentaires sont nécessaires afin d'élucider le rôle de ces protéines dans la liaison à la MEC et donc dans la pathogenèse de *C. difficile*, et en particulier en ce qui concerne l'interaction de la bactérie avec la muqueuse intestinale.

II.2.2.3. Protéine de choc thermique GroEL

L'adhésion de *C. difficile* aux cellules épithéliales *in vitro* augmente après un choc thermique (220). Ce phénomène a conduit à l'identification et à la caractérisation de la protéine Cwp66 mais a également suggéré un rôle pour d'autres protéines de choc thermique telle que GroEL (ou Hsp60 pour *heat shock Protein*) dans les propriétés d'adhésion de la bactérie. GroEL est une protéine de 58 kDa qui est exprimée après exposition à un certain nombre de stress incluant la chaleur, le choc acide ou osmotique, la privation en fer, la présence de concentrations sub-inhibitrices d'ampicilline ou le contact avec des cellules eucaryotes *in vitro* (220). Après un choc thermique, GroEL a été associée à la surface et même libérée dans le milieu extracellulaire. Des expériences de fractionnement cellulaire ont montré que GroEL est retrouvée dans le cytoplasme ainsi que dans la membrane bactérienne (220,298). Des anticorps anti-GroEL ainsi que la protéine GroEL purifiée inhibent l'adhésion de *C. difficile* aux cellules eucaryotes *in vitro*, suggérant que cette protéine joue un rôle dans l'adhésion (298). Plus récemment, des études d'immunisation utilisant la protéine GroEL recombinante ont réduit la colonisation intestinale de *C. difficile* chez les souris infectées, suggérant un rôle pour GroEL dans l'adhésion intestinale de *C. difficile* (299).

II.2.2.4. Les flagelles

La formation de flagelles par de nombreuses espèces bactériennes leur confère la capacité d'être mobile, de coloniser des surfaces abiotique ou biotiques, une optimisation de la croissance et la survie, et un échappement à la dessiccation dans un environnement hostile (300). Le flagelle comprend un moteur moléculaire, un complexe de corps basal et de crochet, et un filament en rotation qui est considéré comme un système de sécrétion de type III spécialisé dérivé d'une structure ancestrale (Figure 14)(301).

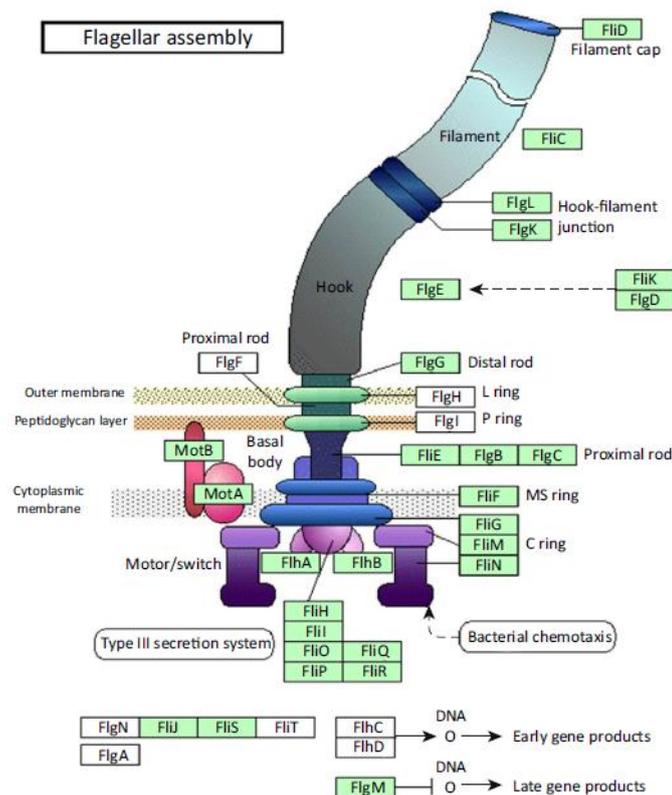


Figure 14. Représentation schématique de la structure du flagelle bactérien. Organisation structurale représentative d'un flagelle dans une bactérie à Gram-négatif. Le complexe corps-basal (*basal body*) intégral permet la translocation de protéines structurales et les protéines du crochet (*hook*) hors de la cellule. La structure du crochet ancre les protéines filamenteuses au corps basal, permettant la formation d'un flagelle mature. La rotation du flagelle entièrement formé est possible grâce au moteur interne et aux protéines attachées au complexe corps-basal. Les gènes flagellaires indiqués en vert correspondent aux gènes identifiés et/ou caractérisés chez les souches 630 et R20291 de *Clostridium difficile* (71).

Les composants du flagelle fonctionnent ensemble pour assurer la mobilité bactérienne. Les protéines du moteur fournissent la puissance au complexe du corps basal et du crochet pour induire la rotation du flagelle apportant ainsi une mobilité à la bactérie (301). Le corps basal est un complexe protéique membranaire intégral qui sert également de structure passive permettant la translocation d'autres protéines structurales flagellaires à l'extérieur de la cellule (301,302). Une fois ces protéines assemblées, la structure du crochet agit comme un joint universel auquel les protéines de filament peuvent être assemblées de manière hélicoïdale. Les flagelles bactériens ont été impliqués dans la pathogenèse bactérienne (i) en favorisant l'adhésion aux cellules hôtes ; (ii) en fournissant une mobilité pour accéder aux nutriments ; (iii) en facilitant la formation de biofilm ; (iv) en facilitant la translocation des facteurs de virulence à travers les membranes cellulaires ; et (v) en agissant en tant qu'immunomodulateurs en déclenchant une réponse pro-inflammatoire à travers la voie de signalisation du *Toll-like receptor* (TLR5) (301). La mobilité induite par le flagelle est importante pour nombreux pathogènes gastro-intestinaux dont *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae* et *Helicobacter pylori* (302). Des mutations dans les gènes flagellaires de ces bactéries ont

rendu les souches moins capables de coloniser l'hôte, d'adhérer aux cellules épithéliales intestinales et incapable d'établir des infections persistantes. Par ailleurs, les mutants flagellaires de *C. jejuni* présentent une déficience dans la sécrétion de certaines protéines de virulence (303–307). Ainsi, comme *C. difficile* occupe une niche environnementale similaire à celle de ces pathogènes intestinaux, les flagelles de *C. difficile* pourraient également jouer un rôle important dans la colonisation et la pathogénicité de la bactérie.

Chez *C. difficile*, le monomère de flagelline (FliC) est le composant protéique structural principal du filament des flagelles. Ces monomères de FliC sont assemblés de manière répétée pour constituer le filament flagellaire. Les protéines associées au crochet HAP1, HAP2 et HAP3 (HAP pour *hook-associated proteins*) sont essentielles pour raccorder le filament au crochet. Le filament est surmonté à son extrémité distale par la protéine FliD formant une coiffe (308).

Les flagellines bactériennes sont constituées de 250 à 1080 acides aminés en fonction des espèces. Chez *C. difficile*, la protéine FliC est codée par le gène *fliC*, présent en un seul exemplaire sur le chromosome bactérien et constitué de 960 pb correspondant à 319 acides aminés. Il est intéressant de remarquer que le gène *fliC* est présent chez toutes les souches de *C. difficile* qu'elles soient flagellées, ou non (309). La masse moléculaire calculée de la protéine FliC en se basant sur la séquence nucléotidique est de 30,9 kDa mais diffère de la masse moléculaire observée en SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) qui est de 39 kDa. Cette différence est expliquée par la présence de modifications post-transcriptionnelles et plus précisément d'une O-glycosylation (310). Les études de cristallographie des flagellines bactériennes ont mis en évidence quatre domaines distincts D0, D1, D2 et D3 au sein de la flagelline (311,312). Les premiers domaines D0 et D1 forment une région hautement conservée parmi les flagellines bactériennes, constituée de 160 acides aminés dans l'extrémité N-terminale, et 90 résidus dans l'extrémité C-terminale. Cette région joue un rôle important dans la polymérisation des filaments de flagelline. Le domaine D0 n'est pas structuré lorsqu'il est en solution mais il adopte une structure en hélice alpha (α) dans le flagelle. Le domaine D1 est organisé principalement en hélice α (313). Chaque surface convexe des domaines D0 et D1 d'une molécule de flagelline interagit avec la zone concave de ces mêmes domaines dans le monomère de flagelline adjacent, permettant ainsi l'élaboration d'un polymère stable. Cette région D0-D1 est essentielle également dans la signalisation cellulaire via le récepteur spécifique des flagellines, le *Toll-like receptor 5* (TLR5, voir chapitre III.1.1 « Les Toll-like receptors »). La seconde région est constituée des domaines D2 et D3 extrêmement variables dans la séquence de la protéine d'une espèce bactérienne à une autre (311,312). La structure tridimensionnelle de la flagelline et sa conformation spatiale est principalement en hélice α avec un fort taux d'alanine et une faible

représentation de résidus proline. Cette région confère à la flagelline son immunogénicité, et est impliquée dans la réponse immunitaire innée (314). Cependant, le rôle respectif de chacun de ces domaines reste très débattu (315).

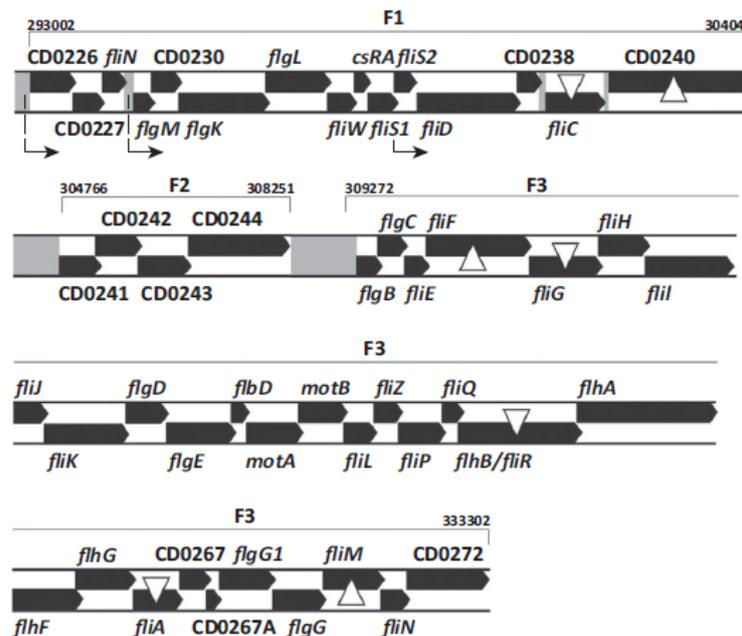


Figure 15. Organisation génétique de l'opéron flagellaire chez la souche 630 de *Clostridium difficile*. Les flèches noires représentent des cadres de lecture ouverts avec une annotation au-dessus ou au-dessous des gènes respectifs. Les trois régions flagellaires sont indiquées par un crochet au-dessus du locus du gène (F1, gènes flagellaires de la phase terminale ; F2, gènes de glycosylation flagellaire ; F3, gènes flagellaires du stade précoce). Les triangles blancs représentent des sites d'insertion pour la mutation ClosTron effectués par les auteurs de la figure et les zones grises représentent les régions non codantes de l'ADN (71).

La coiffe des flagelles est formée par la protéine FliD, codée par le gène *fliD* (1 524 nucléotides correspondant à une séquence de 507 acides aminés). La masse moléculaire de FliD calculée à partir de cette séquence est de 56 kDa et ne diffère pas de celle déterminée par SDS-PAGE. La séquence en acides aminés est très conservée parmi les souches de *C. difficile*. Le gène *fliD* est également présent chez toutes les souches flagellées et non flagellées (281).

Les gènes qui contrôlent l'assemblage des flagelles de *C. difficile* sont organisés en trois opérons (figure 15) (316). Le locus F3 contient les gènes de stade précoce, et inclut le facteur FliA sigma (également appelé SigD). FliA contrôle l'expression des gènes flagellaires de la phase terminale du locus F1, tels que les gènes codant la flagelline FliC et la protéine de coiffe FliD (308,317). La région F2 est responsable des modifications post-traductionnelles du flagelle essentielles pour l'assemblage fonctionnel des flagelles et la mobilité de *C. difficile* (310,318). Les trois locus sont variables parmi les souches de *C. difficile* (68,319).

Chez d'autres bactéries pathogènes mobiles, l'expression flagellaire des gènes est étroitement régulée par les conditions environnementales (320,321). Chez *C. difficile*, les gènes impliqués dans la mobilité sont exprimés à plus haut niveau pendant la phase de croissance exponentielle et sont sous le contrôle négatif du facteur sigma alternatif SigH (322). *In vivo*, deux études ont rapporté des résultats discordants : dans le modèle de souris monoxénique, il n'a pas été observé de modulation des trois opérons de l'ensemble flagellaire durant une cinétique de 8 h à 38 h après l'infection, alors que dans le modèle d'anse ligaturée de porc certains gènes flagellaires ont été surexprimés à 4 h après l'infection et inhibés au-delà (316,323). Cela suggère que les gènes flagellaires sont exprimés très précocement au cours de la phase de colonisation et pourraient être impliqués dans le processus de colonisation. En outre, la production d'anticorps anti-flagelline spécifiques chez les patients indique que les flagelles sont exprimés au cours de l'ICD chez l'homme (285,324).

Les premières études sur le rôle des flagelles dans le processus de colonisation ont montré que les deux protéines flagellaires purifiées FliC et FliD sont capables de se lier au mucus murin. En outre, les souches naturellement non flagellées sont moins adhérentes au caecum de souris que les souches flagellées, mais cela n'entraîne pas une diminution de la colonisation intestinale (309). Cela suggère un rôle de la flagelline et de la coiffe flagellaire dans l'interaction avec le mucus de l'hôte ; ainsi, les propriétés adhésives des protéines flagellaires pourraient favoriser la liaison de *C. difficile* au mucus, suivie par le franchissement du mucus grâce à la mobilité des flagelles.

Plusieurs études sur des mutants flagellaires ont essayé de décrire plus précisément le rôle de l'appareil flagellaire dans l'adhésion et le processus de colonisation. Dans le contexte de la souche 630, les souches mutantes *fliC* ou *fliD* ont montré à plusieurs reprises une adhésion accrue aux cellules Caco-2 (modèle de cellules épithéliales intestinales humaines ne produisant pas de mucus) suggérant que les flagelles et la motilité ne contribuent pas, ou peuvent même interférer avec l'adhésion de *C. difficile* aux cellules *in vitro*. Cependant, les niveaux de colonisation *in vivo* de ces mutants *fliC* et *fliD*, évalués par l'excrétion fécale de *C. difficile*, étaient constamment similaires à ceux de la souche parentale, quel que soit le modèle animal utilisé (318,325,326). D'une manière intéressante, le mutant *fliC* de la souche 630 pourrait induire une rechute, dans un modèle murin d'infection, plus rapidement que la souche parentale après traitement antibiotique (318). En revanche, chez la souche R20291 du ribotype 027, l'adhésion aux cellules Caco-2 est significativement réduite à la fois pour le mutant *fliC* et *fliD*. Le mutant *fliC* a montré une diminution de la capacité de colonisation par rapport à la souche parentale dans un modèle de souris dixénique où deux souches sont en compétition (326). Cela peut être lié soit à la perte de propriétés adhésives des protéines FliC et FliD ou à la régulation négative d'autres protéines

impliquées dans l'interaction avec l'hôte. En effet, l'analyse transcriptomique du mutant *fliC* de la souche R20291 a révélé qu'un grand nombre de gènes semblent être modulés (327). Par exemple le gène *CDR0802*, codant la lipoprotéine annotée CD630_08730 ayant des propriétés adhésives, a été fortement inhibée dans le mutant *fliC*. Toutefois, une souche mutante dans le gène du moteur *motB*, possédant un flagelle paralysé adhère plus que le mutant *fliC* aux cellules Caco-2, bien qu'il adhère moins que la souche parentale, ce qui suggère que la structure flagellaire intacte a des propriétés adhésives indépendamment de la mobilité médiée par le flagelle (326). Ces résultats suggèrent que les flagelles ne sont pas requis pour l'adhésion et la colonisation de la souche R20291, mais la mobilité médiée par les flagelles pourrait contribuer aux *fitness* de la bactérie. Pour résumer, le rôle des flagelles dans le processus de colonisation est encore peu clair et peut varier selon la souche. En particulier, le rôle de FliC et de FliD dans la liaison aux cellules muqueuses et / ou épithéliales et les conséquences sur le processus de colonisation restent encore à élucider.

Les mutations dans les opérons flagellaires ont un impact considérable sur la virulence de *C. difficile*, même lorsque des niveaux de colonisation similaires sont atteints. Chez la souche 630, les mutants *fliC* et *fliD* étaient tous deux plus virulents que la souche parentale. *In vitro*, ces mutants ont produit de plus grandes quantités de toxines, ce qui a entraîné une cytotoxicité sur différentes lignées cellulaires (325). La cytotoxicité plus élevée a été confirmée par une étude indépendante et était liée à une augmentation de l'expression de *tcdA*, *tcdB* et de *tcdR* dans le mutant *fliC*. En revanche, le mutant *fliA* (*sigD*) présentait une diminution de la transcription des toxines TcdA et TcdB associée à une cytotoxicité diminuée sur les fibroblastes humains (302). La relation entre l'expression des opérons flagellaires et la production des toxines dans la souche 630 a été analysée plus en détail : le facteur sigma FliA / SigD active directement l'expression de *tcdR* en dirigeant l'ARN polymérase pour reconnaître le promoteur *tcdR* et activer sa transcription. TcdR active à son tour la transcription de *tcdA* et *tcdB* (328,329). Concernant la souche R20291, le mutant *fliC* entraîne la mort de 70 % des souris monoxéniques, comparativement aux souris axéniques infectées par la souche parentale (pas de mortalité), bien que les deux souches aient exprimé une quantité similaire de toxines, à la fois *in vitro* et *in vivo* (327). La comparaison des profils d'expression globale de gènes entre le mutant *fliC* de la souche R20291 et sa souche parentale en utilisant une approche transcriptomique *in vitro* et *in vivo* chez les souris axéniques, a montré, chez le mutant *fliC*, une surexpression considérable de gènes impliqués dans la mobilité, les systèmes de transport membranaire (PTS, transporteurs ABC), le métabolisme du carbone, les facteurs de virulence connus et la sporulation. Une surexpression plus faible mais significative des gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la fermentation, le métabolisme, le stress et la résistance

aux antibiotiques était également observée, suggérant que ces gènes peuvent être associés à la virulence accrue du mutant *fliC* de la souche R20291 (327).

II.3. Les toxines

En réponse à la disponibilité limitée des éléments nutritifs, *C. difficile* produit des toxines qui ciblent principalement les cellules épithéliales intestinales. Après l'endocytose des toxines et leur activation dans le cytosol, les cellules épithéliales subissent une nécrose qui entraîne une perte d'intégrité de la barrière intestinale, une exposition de l'hôte aux microorganismes intestinaux et une activation de la réponse inflammatoire de l'hôte.

II.3.1. Les toxines TcdA et TcdB

II.3.1.1. Régulation de l'expression

Bien que plusieurs facteurs de virulence contribuent à la persistance de *C. difficile* dans le tractus gastro-intestinal (330,331), les symptômes associés à l'ICD sont en corrélation avec la présence dans le génome bactérien d'un locus de pathogénicité (PaLoc) codant les toxines (332,333). Dans la plupart des souches, le PaLoc est localisé au même endroit dans le chromosome (Figure 16a) (334), et dans la plupart des souches pathogènes, le PaLoc code les deux grandes toxines homologues, TcdA et TcdB, ainsi que trois protéines régulatrices de la production et de la sécrétion de ces toxines (TcdR, TcdE et TcdC) (330,331,334).

TcdR est un membre de la famille de facteurs sigma extracytoplasmiques dont le rôle est critique pour l'initiation de la production de TcdA et de TcdB chez *C. difficile* (335,336). Il est suggéré que TcdC code un facteur anti-sigma qui régule négativement la production des toxines (337). Les souches du ribotype 027 épidémique portent une mutation non-sens au sein du gène *tcdC*, ce qui pourrait contribuer à l'augmentation de la virulence de ces souches (69). Cependant, malgré de nombreuses études visant à définir le rôle de TcdC dans la production de toxines et la virulence, des résultats contradictoires ont été rapportés et le rôle fonctionnel de cette protéine reste incertain (331).

TcdE a une homologie avec les protéines holines de bactériophages, qui sont impliquées dans la libération des phages synthétisés dans les cellules bactériennes infectées (338). Le rôle de TcdE est également mal compris, bien que certaines preuves suggèrent que la protéine facilite la sécrétion des toxines TcdA et TcdB (334,339,340). TcdA et TcdB ne possèdent aucun signal reconnaissable ou de séquences d'exportation, ce qui suggère qu'elles pourraient être exportées de la cellule

bactérienne par lyse ou par une voie de sécrétion non classique, impliquant éventuellement TcdE (339,340).

La synthèse de TcdR et l'activation subséquente de l'expression de *tcdA* et *tcdB* sont influencées par de nombreux stimuli environnementaux, y compris les acides gras à chaîne courte tels que l'acide butyrique qui sont communs dans les fluides intestinaux (335,341–344). Les acides aminés dont la proline, la cystéine et certains acides aminés à chaîne ramifiée présents dans l'environnement local de la bactérie inhibent la production de toxines par l'action du régulateur transcriptionnel global CodY (répresseur pléiotrope transcriptionnel GTP-sensing CodY) (244). La présence de glucose ou d'autres sources de carbone rapidement métabolisables dans l'environnement local de la bactérie inhibe également la production de TcdA et de TcdB via la protéine A de contrôle du catabolite du carbone (CcpA) (245,345).

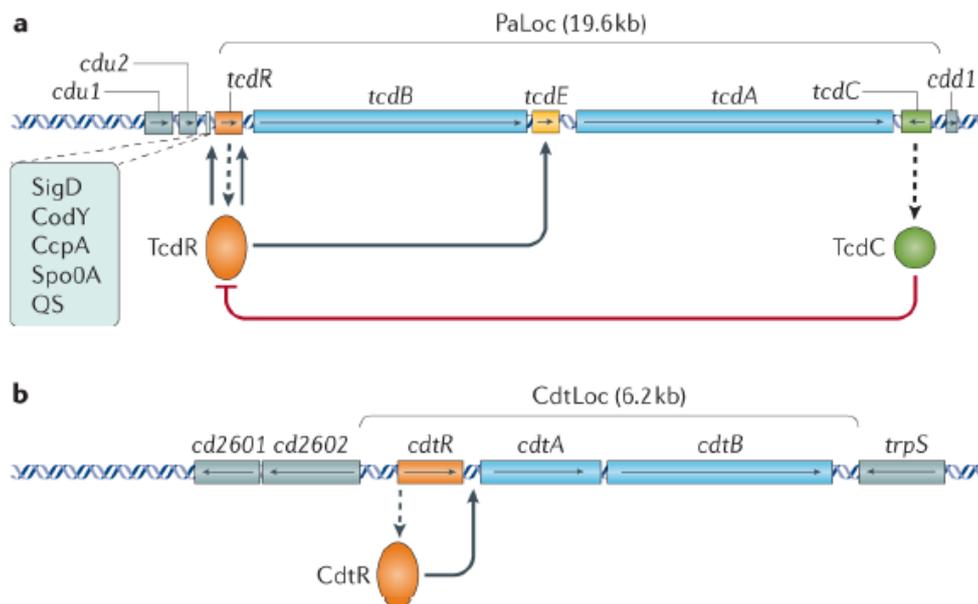


Figure 16. Régulation des toxines de *Clostridium difficile*. **a.** Représentation schématique du locus de pathogénicité (PaLoc) et des interactions régulatrices de la production des toxines TcdA et TcdB de *Clostridium difficile*. Les cases avec des flèches indiquent des cadres ouverts de lecture (ORF) et la direction des flèches indique la direction de la transcription. Les gènes des toxines *tcdA* et *tcdB* sont en bleu, les gènes régulateurs sont en orange (positif) et en vert (négatif) ; *tcdE* est en jaune et les gènes situés en dehors du PaLoc sont en gris. Les flèches en pointillés indiquent la production de protéines à partir d'un transcrit génique. D'autres régulateurs (encadré bleu) comme Sigma D (SigD), CodY un répresseur nutritionnel pléiotrope transcriptionnel sensible au GTP, CcpA, la protéine de contrôle des catabolites A, Spo0A, la protéine A de sporulation affectent la transcription des gènes de toxines et agissent principalement via l'expression du gène *tcdR*. La protéine TcdR est impliquée dans l'initiation de la production de TcdA et de TcdB. **b.** Représentation schématique du locus de la toxine binaire (CdtLoc) et des interactions régulatrices. Les boîtes avec des flèches indiquent des cadres ouverts de lecture avec des flèches indiquant la direction de la transcription. Les gènes de la toxine *cdtA* et *cdtB* sont en bleu, le gène régulateur *cdtR* est en orange et les gènes situés en dehors du CdtLoc sont en gris (2).

Le facteur sigma SigD, qui est associé à l'expression des gènes de la motilité, favorise l'expression des gènes des toxines en se liant à une séquence de promoteur dépendant de SigD en amont de *tcdR* (328). Le régulateur principal de la sporulation Spo0A régule négativement la production de TcdA et de TcdB dans les souches de ribotype 027 épidémiques, mais cet effet n'est pas retrouvé dans d'autres souches testées (243,346,347). Enfin, les signaux de croissance et la densité cellulaire jouent un rôle important dans la régulation des toxines. Dans l'ensemble, la synthèse des toxines chez *C. difficile* est étroitement liée à l'état métabolique de la bactérie et de son environnement (348).

II.3.1.2. Structure et mécanisme d'action de TcdA et TcdB

Des études structurales et fonctionnelles ont fourni un aperçu des mécanismes d'action des toxines TcdA et TcdB de *C. difficile*. Une fois sécrétées, TcdA et TcdB se lient et entrent dans l'épithélium colique pour induire la production de chimiokines et de cytokines inflammatoires, un afflux de neutrophiles, la rupture de jonctions serrées et la mort des cellules épithéliales (197).

Malgré l'homologie entre les deux protéines, TcdA et TcdB ont des fonctions nettement différentes dans les modèles de toxicité chez l'animal. Historiquement, TcdA a été considérée comme l'entérotoxine la plus puissante, car l'administration de TcdA purifiée dans l'intestin de lapins et de rongeurs provoque une nécrose tissulaire et une infiltration intense des cellules immunitaires (349–351). Des niveaux élevés de TcdB dans des expériences identiques n'ont pas induit ces effets, bien qu'il faille noter que la plupart de ces études ont été conduites dans un modèle en boucle iléale et, par conséquent, ne représentent que la réponse de l'intestin grêle. Dans les études impliquant le tissu du côlon humain, TcdB semble être une toxine inflammatoire puissante, tandis que TcdA possède une activité plus faible (352,353). Ces données suggèrent que les réponses différentielles des toxines pourraient provenir en partie des différences dans le tropisme des récepteurs et mettent en évidence l'importance de conduire des études mécanistiques dans le côlon, qui est le site de développement de *C. difficile* chez l'hôte.

Les toxines TcdA et TcdB possèdent quatre domaines fonctionnels : 1) un domaine de glycosyltransférase amino-terminal (GTD), 2) un domaine d'autoprotéase (APD), 3) un domaine de formation de pores et de livraison, et 4) un domaine de séquences répétées d'oligopeptides combinés (CROPS), qui s'étend du résidu 1830 jusqu'à l'extrémité C-terminale (Figure 17a) (197,354). Une série d'études en microscopie électronique et cristallographie aux rayons X a révélé l'organisation structurelle de ces domaines dans TcdA et suggère que la structure de TcdB est similaire (Figure 17b) (354,355). TcdA et TcdB pénètrent dans les cellules via l'endocytose médiée par un récepteur (356). Historiquement, la liaison au récepteur a été associée à un domaine CROPS

situé à l'extrémité C-terminale de TcdA et TcdB (357). Le domaine CROPS est capable de lier les hydrates de carbone, ce qui est cohérent avec le modèle dans lequel TcdA met en jeu des récepteurs glycosylés (357). Les preuves soutenant l'idée que le domaine CROPS contribue à la liaison au récepteur incluent les observations selon lesquelles les anticorps contre le domaine CROPS peuvent bloquer l'intoxication et que l'excès de domaine CROPS peut concurrencer l'holotoxine TcdA pour la liaison cellulaire (358,359). TcdA se lie à divers glucides, et bien que de multiples glycolipides et protéines glycosylées aient été proposés comme récepteurs, les récepteurs spécifiques utilisés pour lier les cellules épithéliales humaines restent inconnus (355).

Cependant, l'accumulation de preuves suggère que d'autres domaines que les CROPS participent à la liaison au récepteur. En effet, TcdA et TcdB dépourvus de domaines CROPS sont toujours capables d'intoxiquer les cellules, et la toxine homologue TpeL de *Clostridium perfringens* manque totalement d'un domaine CROPS (340,360,361). Récemment, deux récepteurs de nature protéique ont été rapportés pour TcdB : la protéine de type récepteur du poliovirus 3 (PVRL3, également appelée nectine 3) et le protéoglycane sulfate de chondroïtine 4 (CSPG4) (362,363). PVRL3 est fortement exprimé à la surface des cellules épithéliales du côlon humain et co-localise avec TcdB dans le tissu réséqué d'un individu infecté par *C. difficile*, suggérant que PVRL3 pourrait servir de récepteur initial à TcdB (362). CSPG4 est fortement exprimé dans les myofibroblastes intestinaux sous-épithéliaux des intestins de souris et humains, suggérant que ce récepteur pourrait être engagé après une lésion initiale de l'épithélium colique (363,364). Les deux récepteurs CSPG4 et PVRL3 se lient en dehors du domaine CROPS (362,363). Ces données suggèrent que d'autres récepteurs alternatifs supplémentaires pour TcdB pourraient exister.

Après la liaison au récepteur et l'endocytose qui s'en suit, l'acidification de l'endosome déclenche une modification structurelle dans le domaine de livraison, facilitant la formation de pores et la translocation de la GTD dans le cytosol (355). L'autoprotéase APD partage une homologie de séquence avec la cystéine protéase de la famille des toxines MARTX, une publication a montré que la dyade catalytique de TcdA et TcdB sert à coordonner un ion de zinc qui est essentiel pour sa fonction (354,365,366). L'activation de l'APD par l'inositol hexaphosphate (InsP6) entraîne la libération de la GTD dans la cellule, permettant l'accès aux substrats cytosoliques (365,366). La GTD transfère le glucose de l'UDP sur les GTPases de la famille Rho telles que Rho, Rac1 et la *cell division control protein 42* (Cdc42) (367,368). Ces modifications provoquent un effet cytopathique résultant de la perturbation du cytosquelette d'actine et peuvent conduire à l'apoptose (Figure 17c) (369). À des concentrations plus élevées, TcdB est également capable de coordonner l'assemblage du complexe NADPH oxydase sur les endosomes (370). La production d'espèces réactives de l'oxygène résultante conduit à la mort cellulaire par un mécanisme nécrotique (Figure

17d)(370). Les deux mécanismes peuvent être importants dans le contexte de la maladie ; les effets cytopathiques favorisent l'inflammation et la perturbation des jonctions serrées, alors que la nécrose induite par le TcdB contribue à l'atteinte tissulaire du côlon observée dans les cas graves d'ICD.

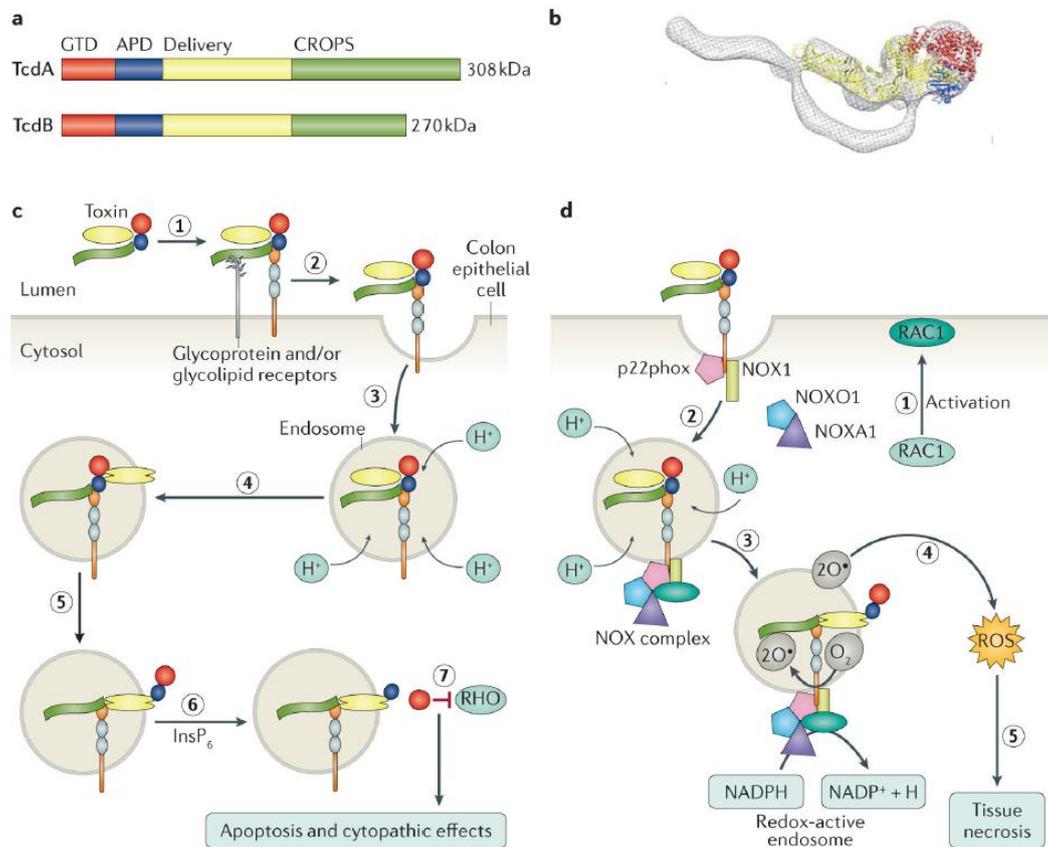


Figure 17. Structure et fonction des toxines de *Clostridium difficile*. **a.** Schéma des structures primaires des toxines TcdA et TcdB, montrant les quatre domaines fonctionnels : le domaine glycosyltransférase (GTD ; rouge), le domaine autoprotéase (APD ; bleu), le domaine de livraison (jaune) et le domaine des oligopeptides répétitifs combinés (CROPS) (vert) qui lie les glucides à la surface de la cellule hôte pour faciliter la pénétration des toxines. **b.** Superposition d'une reconstruction au microscope électronique de la structure de TcdA avec la structure cristalline aux rayons X de TcdA dépourvue du domaine CROPS (*Protein data bank* code 4R04). Le code couleur reflète la structure des domaines de la figure a. **c.** Les domaines structurels et fonctionnels des toxines contribuent à un mécanisme d'intoxication en plusieurs étapes. (1) Les toxines se lient à un ou plusieurs récepteurs (glucides et / ou protéines) à la surface des cellules et sont internalisées par endocytose (2). (3) La V-ATPase contribue à une diminution du pH. Le pH acide provoque un changement conformationnel dans le domaine de livraison de la toxine, entraînant la formation de pores (4) et la translocation de l'APD et du GTD dans le cytosol (5). L'hexaphosphate d'inositole (InsP₆) se lie et active l'APD, entraînant la libération du GTD (6), qui peut inactiver les protéines de la famille Rho (7) pour provoquer une apoptose et des effets cytopathiques d'arrondissement des cellules. **d.** À des concentrations > 0,1 nM, la toxine TcdB peut favoriser l'activation du *RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) (1) et la formation d'un complexe entre le p22phox (également appelé chaîne légère du cytochrome b-245), la NADPH oxydase 1 (NOX1), *NADPH oxidase activator 1* (NOXA1), *NADPH oxidase organizer 1* (NOXO1) et Rac1 sur la membrane endosomale pour former le complexe NOX (2). Le complexe NOX entièrement assemblé génère du superoxyde en transférant un électron de NADPH à l'oxygène moléculaire (3). La production de superoxyde (5) conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui - à des niveaux élevés - favorisent la nécrose en provoquant des lésions mitochondriales, la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines (2).

La connaissance des mécanismes d'action des toxines de *C. difficile* a servi de base à plusieurs études précliniques visant à identifier les inhibiteurs d'intoxication à petites molécules, en particulier ceux qui sont déjà approuvés pour d'autres utilisations (371). Un criblage récent d'inhibiteurs des effets cytopathogènes induits par TcdB a identifié des composés qui agissent en inhibant la liaison de la toxine aux cellules, la maturation endosomale ou la fonction glycosyltransférase (372). Un autre criblage a permis d'identifier « *Ebselen* », une petite molécule synthétique organoséléniée approuvée par la FDA (US Food and Drug Administration), qui réduit l'inflammation tissulaire dans un modèle d'infection de la souris (373). Il a également été rapporté qu'*Ebselen* bloquait l'activité de la NADPH oxydase, une fonction qui pourrait contribuer à une diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène induite par la toxine (374). De même, la N-acétylcystéine, un antioxydant approuvé par la FDA, a empêché les lésions tissulaires induites par TcdB dans un modèle d'explant colique (370).

II.3.1.3. Toxicité de TcdA et TcdB

Bien que les rôles de TcdA et de TcdB dans le contexte de l'ICD aient été difficiles à évaluer, des progrès récents ont été réalisés grâce à la manipulation génétique de *C. difficile*. Quatre études ont été menées sur des modèles d'infection de hamsters et de souris. Toutes les études indiquent que TcdB est capable d'induire les phénotypes de la maladie en l'absence de TcdA, mais diffèrent sur l'interprétation du rôle de TcdA en l'absence de TcdB sur la survie des animaux (70,375). L'examen histologique du tissu colique et caecal de souris infectées par des souches TcdA⁺TcdB⁺ ou TcdA⁻TcdB⁺ de *C. difficile* a montré des lésions intestinales sévères associées à des cryptes érodées, à des ulcérations muqueuses et à une perte des cellules caliciformes (375). Un afflux de leucocytes polymorphonucléaires dans la lamina propria, une hyperplasie des entérocytes et un œdème sous-muqueux sévère associé à une hémorragie ont également été observés dans ces tissus. Les souches TcdB négatives (TcdA⁺TcdB⁻) ont provoqué moins de dommages tissulaires se limitant à un œdème léger et à un infiltrat de cellules polymorphonucléaires (375).

Conformément à la constatation que TcdB est indépendamment capable de causer la maladie, un nombre considérable d'isolats cliniques de *C. difficile* n'expriment ni la TcdA ni la toxine binaire (376). La prévalence de ces souches, de ribotype PCR 017, a augmenté, parfois jusqu'à des proportions épidémiques (377). Récemment, la première souche avec un gène *tcdA* intact, dans un environnement génomique différent de celui de PaLoc, mais sans gène *tcdB* a été caractérisée (334). Ce travail a soulevé l'hypothèse selon laquelle les locus codant une seule toxine pourraient avoir fusionné pour former le locus typique à deux toxines (PaLoc), qui est la forme la plus couramment détectée actuellement dans les isolats cliniques. Cependant, il convient de noter que

les cas cliniques confirmés d'ICD provoqués par des souches qui ne produisent que TcdA sont extrêmement limités (334).

II.3.2. La toxine binaire CDT

II.3.2.1. Régulation de l'expression

La transférase de *C. difficile* (CDT ou toxine binaire) est une troisième toxine produite par certaines souches de *C. difficile*, y compris les ribotypes PCR épidémiques 027 et 078. La CDT a reçu une attention accrue ces dernières années en raison de sa prévalence croissante dans les isolats cliniques (378). La CDT est codée par deux gènes, *cdtA* et *cdtB*, qui sont situés dans un opéron sur le locus de la toxine binaire (CdtLoc) (Figure 16b) (379,380). Chez les souches CDT-négatives, ce locus contient une délétion d'environ 2 kb (381). Le CdtLoc héberge également un gène régulateur, *cdtR*, en amont de l'opéron *cdtAB* (382). CdtR est un régulateur transcriptionnel positif orphelin de type LytTR-like de l'opéron *cdt* et de la production de CDT. Une protéine CdtR tronquée d'une souche du ribotype 078 de *C. difficile* n'annule pas l'expression de CDT, suggérant que CdtR n'est pas essentiel pour l'expression de la toxine (383). Contrairement au PaLoc, les signaux environnementaux qui régulent l'expression des gènes CdtLoc ne sont pas connus.

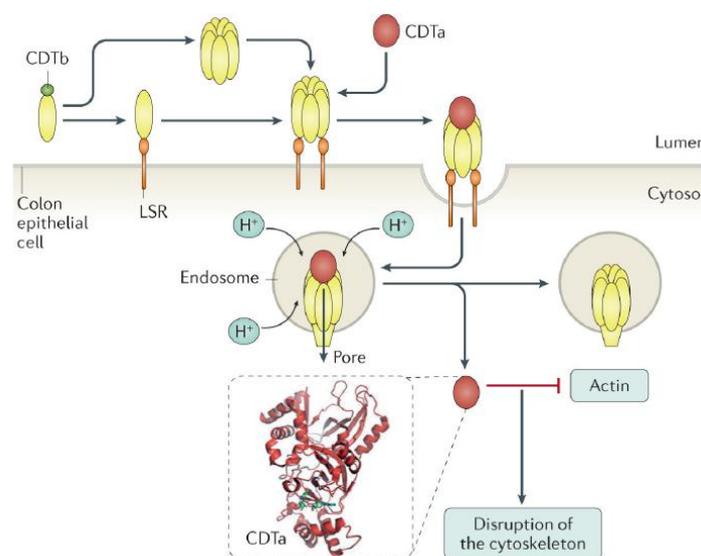


Figure 18. Mécanisme d'action de la transférase de *Clostridium difficile* (CDT ou toxine binaire). La transférase de *Clostridium difficile* (CDT) est une toxine binaire constituée de la protéine CDTa ADP-ribosyltransférase (rouge) et de la protéine CDTb (jaune et vert). La forme monomérique de CDTb se lie au récepteur *lipolysis-stimulated lipoprotein receptor* (LSR), que l'on retrouve dans de nombreux tissus, y compris dans l'intestin. CDTb subit une activation protéolytique et oligomérisation pour former un pré-pore heptamérique, ce qui facilite la liaison de la CDTa au complexe pré-pore-récepteur. Ce complexe pénètre dans la cellule par endocytose et, à mesure que l'endosome arrive à maturité, la V-ATPase contribue à une diminution du pH. Le faible pH de l'endosome déclenche la formation de pores et la translocation de la CDTa dans la cellule. Une fois dans le cytosol, la CDTa, ribosyle l'actine au niveau de l'arginine 177, entraînant un double effet par lequel la polymérisation de l'actine G est inhibée et la dépolymérisation de l'actine F est favorisée, conduisant à la destruction complète du cytosquelette d'actine et à la mort cellulaire (2).

II.3.2.2. Mécanisme d'action de CDT

Des études récentes ont fourni un aperçu des mécanismes d'action de la CDT, bien que le rôle de cette toxine dans la pathogenèse de la maladie reste peu clair. CDT appartient à la famille des toxines ADP-ribosylantes binaires et est constituée de deux composants : un composant enzymatique (CDTa) et un composant de liaison / translocation (CDTb). Le domaine C-terminal de CDTb présente un domaine de liaison qui reconnaît le récepteur aux lipoprotéines LSR (*lipolysis-stimulated lipoprotein receptor*) à la surface de la cellule hôte, une protéine transmembranaire de type I possédant un domaine N-terminal extracellulaire constituée d'une région non caractérisée à l'extrémité N-terminale suivie d'un domaine Ig-like type V. LSR est principalement exprimée dans le foie, mais également dans l'intestin et dans d'autres tissus (384). La protéine CDTb interagit avec le domaine Ig-like de LSR par les acides aminés 757-866 et cette interaction induit le regroupement de LSR dans les radeaux lipidiques (385,386). Les étapes suivantes conduisant à l'internalisation de CDTa dans la cellule hôte et à sa libération dans le cytosol sont expliquées selon le modèle actuel de la toxine iota de *C. perfringens* (Figure 18) (197). Une fois dans la cellule, CDTa agit en ribosylant les monomères d'actine G au niveau de l'arginine 177 de façon irréversible. Cette ADP-ribosylation inhibe la polymérisation de l'actine G en microfilaments d'actine F et rompt l'équilibre entre les deux formes d'actine, ce qui provoque une désorganisation du cytosquelette d'actine, l'arrondissement des cellules et, enfin, une mort cellulaire (387,388).

II.3.2.3. Toxicité de CDT

En dépit d'une compréhension approfondie du mécanisme d'action de la CDT sur les cellules intoxiquées, le rôle de cette toxine dans la pathogenèse de la maladie n'est pas clair. Des données expérimentales ont suggéré que la CDT aboutit à la formation de saillies à la surface des cellules épithéliales qui pourraient augmenter l'adhérence et la colonisation de *C. difficile* (389). Il est important de noter que la présence croissante de CDT dans les souches cliniques communément associées aux ICD sévères, tels que les ribotypes PCR 027 et 078, et l'isolement des souches TcdA⁻TcdB⁻CDT⁺ suggèrent que cette toxine pourrait jouer un rôle important mais encore indéterminé dans les ICD (390,391).

III. L'interaction hôte - *C. difficile*

Après la colonisation de l'intestin par *C. difficile* et la production de toxines perturbant la barrière épithéliale intestinale, les bactéries vont se multiplier et stimuler le système immunitaire de l'hôte. Le système immunitaire inné va être alors rapidement activé à la suite de la reconnaissance par des récepteurs nommés *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), en particulier les TLRs et les NLRs, de différents composants bactériens nommés *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs) : facteurs de virulence, protéines, acides aminés, lipides, fragments d'ADN ou d'ARN.... Les interactions entre les PRRs et les PAMPs aboutissent à des réactions de défense très rapides contre *C. difficile*, lesquelles pourraient être protectrices, mais également délétères dans le cas d'une réponse pro-inflammatoire excessive. Enfin, le système immunitaire adaptatif se met en place pour contrôler le processus infectieux à moyen terme.

III.1. Les *Toll-like receptors* (TLR)

Etant à proximité de la plus grande interface entre le corps et l'environnement externe, le système immunitaire intestinal a évolué pour distinguer la plus petite différence moléculaire existant entre les micro-organismes pathogènes et non pathogènes afin de réagir rapidement à toute menace, avant que le pathogène ne puisse se multiplier ou même avant que des bactéries inoffensives puissent muter et devenir dangereuses (392,393). Par conséquent, dans le tractus gastro-intestinal, le système immunitaire contribue au maintien de l'équilibre délicat qui existe entre les bactéries, les levures, les bactériophages, les virus et l'épithélium intestinal pour garantir l'homéostasie de l'organisme.

La réaction immunitaire provoquée par un pathogène doit être équilibrée et coordonnée, en évitant un surpassement pouvant conduire à des réactions délétères pour l'organisme hôte. Par conséquent, les premiers signaux des pathogènes reconnus par les cellules sont les plus cruciaux. Pendant le processus infectieux, une interaction précoce se produit entre les bactéries potentiellement pathogènes et les récepteurs *Toll-like* (TLR) présents sur la membrane des cellules immunitaires intestinales, ainsi que sur la membrane cellulaire de l'épithélium intestinal (394,395).

Les TLRs appartiennent à la famille des PRRs. Ils reconnaissent les molécules largement partagées par les agents pathogènes : les PAMPs et les modèles moléculaires associés aux microbes (MAMPs), ces derniers généralement exprimés par les microorganismes résidents du microbiote (396,397). De plus, les TLRs reconnaissent les molécules endogènes dérivées des lésions tissulaires

définies comme des motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires (DAMPs pour *Damage-Associated Molecular Patterns*) (396,398,399) qui comprennent entre autres, des protéines de choc thermique (HSP), les HGMB1 (*HighMobility Group Box 1*), les bêta-défensines et l'acide urique. Conformément à leurs rôles dans la surveillance immunitaire, l'expression des TLRs est élevée dans ces tissus exposés à des environnements externes tels que le poumon et le tractus gastro-intestinal avec des profils uniques et spécifiques des types cellulaires (400,401). Chez les mammifères, 13 TLRs différents ont été identifiés (humain : TLR1-11, souris : TLR1-9, TLR11-13) avec peu de différences fonctionnelles observées entre les TLR humains et murins (402).

Généralement, les TLRs qui reconnaissent spécifiquement des produits bactériens tels que les TLR1 et TLR6 (qui reconnaissent des lipoprotéines di et tri-acylées), le TLR2 (reconnaissant des lipoprotéines, des peptidoglycane de bactéries à Gram positif, des acides lipotéichoïques), le TLR4 (qui reconnaît le lipopolysaccharide - LPS), et le TLR5 (qui reconnaît les flagellines bactériennes) sont des récepteurs transmembranaires exprimés sur la membrane des cellules immunitaires et des cellules épithéliales intestinales. En revanche, les TLRs qui reconnaissent des acides nucléiques tels que TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 et TLR13 sont exprimés exclusivement sur la membrane des compartiments intracellulaires. Le récepteur TLR4 est cependant exprimé à la fois sur les membranes cellulaires (signalisation pro-inflammatoire) et intracellulaires (signalisation anti-inflammatoire) (Figure 19) (402–405).

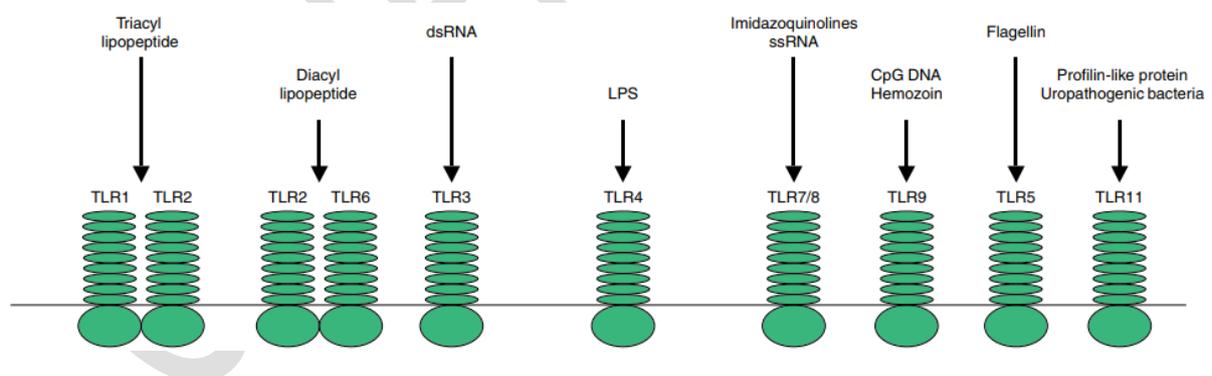


Figure 19. Les différents Toll-like receptors (TLRs) et leurs ligands spécifiques. Les TLR12 et 13 ne sont pas représentés dans cette figure. Leurs ligands respectifs seraient une protéine (la profiline) de *Toxoplasma gondii* et l'ARN ribosomal 23S bactérien. dsRNA : ARN double-brin ; LPS : Lipopolysaccharide ; ssRNA : ARN simple-brin (405).

Il a été montré que la muqueuse du côlon humain sain contient des niveaux plus faibles de TLR2 et TLR4 dans les cellules épithéliales intestinales, avec des niveaux plus élevés de TLR5 (406,407). L'expression des TLRs par les cellules épithéliales intestinales est polarisée et différentielle selon le

niveau de l'intestin (401,406). Les TLR2 et TLR4 sont ainsi principalement localisés aux surfaces basolatérales des entérocytes de l'intestin grêle, de même que le TLR5 qui est localisé principalement sur les surfaces basolatérales des entérocytes dans le côlon (401,406,408). Cette compartimentation est essentielle pour éviter que les bactéries commensales induisent une réponse inflammatoire permanente, et elle est donc cruciale pour l'initiation et la progression des conditions pathologiques (401). Le profil d'expression des TLRs spécifiques s'étend également à d'autres types cellulaires de l'épithélium intestinal tels que les cellules de Paneth, exprimant les TLR2, TLR4 et TLR5, et les cellules du système immunitaire telles que les macrophages et les cellules dendritiques (DC) (409). Une petite proportion de DC intestinales exprime les TLR2 et TLR4, sans différences significatives entre les DC du tissu iléal et colique (410). Les macrophages expriment également les TLR2 et TLR4, mais à des niveaux faibles dans des conditions physiologiques. En revanche, un profil d'expression différent des TLRs se produit dans des conditions pathologiques. Par exemple, les cellules épithéliales intestinales coliques chez les patients atteints d'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI, maladie de Crohn et rectocolite hémorragique) présentent des niveaux d'expression plus élevés de TLR4, ainsi que des niveaux inférieurs de TLR2 et TLR5 (406,411). La localisation cellulaire spécifique des TLRs présente également des changements dans les conditions pathologiques, comme il a été démontré chez les patients atteints de la maladie de Crohn où l'expression basolatérale du TLR4 est décalée vers une expression apicale au niveau des cellules épithéliales intestinales (406,407). A la différence du TLR4, la localisation des TLR2 et TLR5 reste inchangée chez les patients atteints d'une maladie de Crohn par rapport aux contrôles sains (407).

Chaque TLR est composé d'un domaine extracellulaire riche en leucine responsable de la reconnaissance des PAMPs, des DAMPs, ou des MAMPs, un domaine transmembranaire, et un domaine du récepteur Toll-IL-1 (TIR) cytoplasmique responsable de l'initiation de la cascade de signalisation cellulaire (412–414). Le domaine TIR peut recruter (lors de l'activation du TLR spécifique) des adaptateurs différents, MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*), TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), TIRAP / MAL (*TIR domain containing adaptor protein*) et TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), qui sont ensuite responsables d'une réponse biologique spécifique. La protéine MYD88 est utilisée par pratiquement tous les TLRs, alors que TRIF est recrutée par les TLR3 et TLR4, et TRAM est sélectivement recrutée par le TLR4 (412–415). Ainsi, la majorité des récepteurs TLRs partage deux mêmes voies de signalisation : les voies MyD88 dépendante ou MyD88 indépendante (Figure 20) (416).

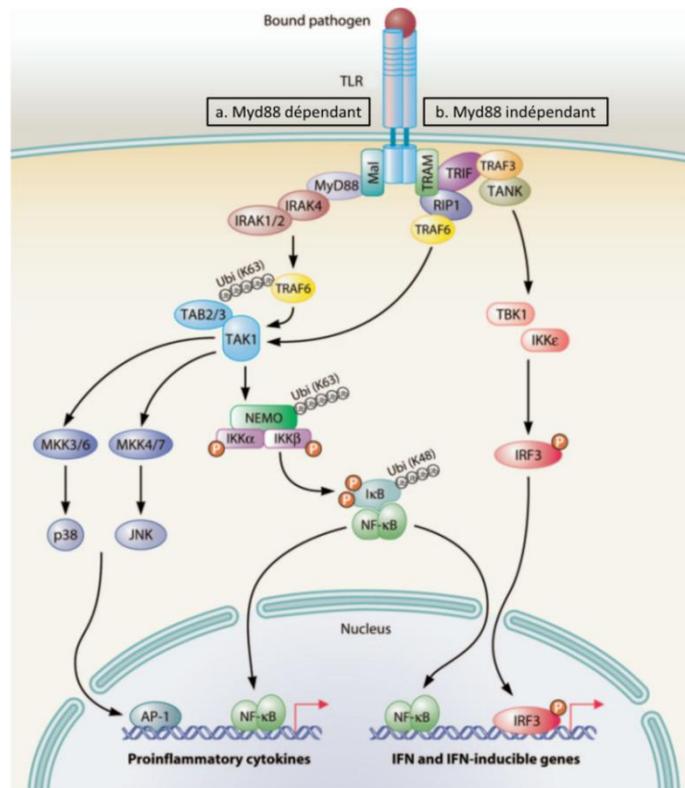


Figure 20. Voies de signalisation des Toll-like receptors. Les récepteurs TLRs pourraient activer des voies de signalisations dépendantes et/ou indépendantes de la protéine adaptatrice MyD88. La voie MyD88 dépendante est responsable de l'activation précoce des voies de NF-κB et des MAPKs qui contrôlent l'induction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires. La voie MyD88 indépendante active le facteur IRF3 nécessaire à l'induction de l'expression de l'IFN gamma et des gènes associés. De plus, cette voie de signalisation peut également aboutir à une activation tardive des voies NF-κB et des MAPK contribuant aux réponses pro-inflammatoires (416).

III.1.1. Voies de signalisation associées aux TLRs

III.1.1.1. Voie de signalisation dépendante de MyD88

La signalisation dépendante de MyD88 est activée lorsque MyD88 est recruté auprès du récepteur au niveau de la membrane plasmique à l'aide de l'adaptateur de pontage TIRAP / MAL (Figure 20) (417). En plus de son domaine TIR, MyD88 possède un domaine de mort à l'extrémité N-terminale et lors de son recrutement, il s'associe aux membres de la famille des protéines kinase associée à l'IL-1R (IRAK), par le biais de leurs domaines de mort (418). Une fois IRAK4 activé, il va phosphoryler et activer à son tour IRAK1 par des résidus de l'extrémité N-terminale (419). Après la phosphorylation séquentielle d'IRAK4 et d'IRAK1, ils se dissocient de MyD88. En même temps, IRAK2 devient phosphorylé et se dissocie du complexe. IRAK1 et IRAK2 interagissent alors avec un adaptateur en aval, TRAF6 (*TNF-receptor associated-factor 6*) (420). TRAF6 est une protéine possédant un domaine RING doué d'une activité ubiquitine ligase E3 qui, avec d'autres molécules dont Ubc13 (*E2 ubiquitin*

conjugating enzyme 13) et Uev1A (*ubiquitin conjugating enzyme E2 variant 1 isoform A*), favorise la polyubiquitination de la lysine 63 (K63) des protéines cibles, y compris elle-même et la protéine NEMO (*NF-kappa-B essential modulator*) connue également sous le nom d'IKK γ (*inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit gamma*) (421,422). Les protéines NEMO et TRAF6 ubiquitinées vont recruter ensuite TAK1 (*transforming growth factor- β -activated kinase 1*) et ses régulateurs : TAB1 (TAK1 binding protein 1), TAB2 and TAB3 (421). Deux autres voies sont ensuite activées, la voie des protéines kinases activées par les mitogènes MAPK (pour *Mitogen-Activated Protein Kinase*) et celle de NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*) débutant par l'activation d'IKK (complexe inhibiteur- κ B Kinase).

Les MAPK sont un groupe d'enzymes intracellulaires traductrices de signaux dont l'activation passe par leur phosphorylation par une MAPK kinase (MAP2K), qui sont elles-mêmes phosphorylées et activées par une MAPKK kinase (MAP3K). TAK1 est une MAP3K qui peut phosphoryler et activer MKK3 (*mitogen-activated protein kinase kinase 3*) et MKK6 (423). Les MAP3Ks phosphorylent et activent consécutivement JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) et la voie de p38. L'activation de ces deux voies MAPK induit l'activation du facteur de transcription AP-1 (*Activator Protein 1*). AP-1 coopère avec NF- κ B pour réguler l'expression d'un nombre important de gènes.

Le complexe IKK est constitué de deux protéines kinases IKK α et IKK β avec la protéine d'échafaudage NEMO qui est essentielle pour la régulation et l'activation du complexe (422,424). TAK1 ubiquitine phosphoryle IKK β et active le complexe IKK (425). NF- κ B dans son état naturel est associé aux protéines I κ B (inhibitrices de NF- κ B), mais lorsqu'il est activé, le complexe IKK phosphoryle I κ B. Il les marque comme cibles pour l'ubiquitination et la dégradation dans le protéasome 26S (426). NF- κ B se lie alors aux sites κ B dans les régions promotrices de ses gènes cibles, y compris des gènes codant des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires.

Le Nuclear Factor κ B

Les protéines de la famille de NF- κ B ont été décrites en 1986 lors de la découverte fortuite de trois protéines NF- κ B, ν -Rel et Dorsal (427–430). Ces protéines ont depuis été largement étudiées et caractérisées comme étant membres de la même famille de protéines avec des fonctions biologiques dans l'immunité (NF- κ B), l'oncogenèse (ν -Rel) et le développement (Dorsal) (431). La plus grande famille de protéines NF- κ B est composée de deux sous-familles phylogénétiquement conservées : les protéines NF- κ B et les protéines Rel (p100, p105 et Relish ou l'hétérodimère spécifique p50-RelA, qui est le principal dimère de NF- κ B dans de nombreuses cellules). Toutes ces protéines partagent un domaine de 300 acides aminés nommé RHD (*Rel homology domain*) responsable de la translocation nucléaire, la liaison à l'ADN et la dimérisation (Figure 21) (432).

La sous-famille Rel comprend c-Rel, Rel B, Rel A également appelée p65, *Drosophila* Dorsal et Dif. La sous-famille NF- κ B comprend p105, p100 et la *Drosophila* Relish lesquelles se distinguent par leurs longs domaines C-terminaux qui contiennent plusieurs copies répétitifs d'ankyrine (431). Les protéines NF- κ B p100 et p105 sont clivées et leurs répétitions d'ankyrine C-terminales sont supprimées pour devenir des protéines de liaison à l'ADN actives plus courtes. p105 est constitutivement clivée en p50 formant à la fois des dimères contenant p50 et p105, tandis que le clivage de p100 en p52 dépend des stimuli et p52 se lie préférentiellement à Rel B (433). En raison de l'absence des domaines d'activation C-terminal, les homodimères de p50 et p52 ne sont pas capables d'activer la transcription mais agissent plutôt comme des répresseurs transcriptionnels (426). Les sous-unités Rel forment des homo- ou des hétérodimères et les différentes combinaisons dimériques qui se forment ciblent des séquences d'ADN légèrement différentes permettant une activité transcriptionnelle distincte de ces différents dimères de NF- κ B (434).

Les protéines de la sous-famille de NF- κ B ne sont généralement pas des activateurs de la transcription, sauf lorsqu'ils forment des dimères avec des membres de la sous-famille Rel : la forme prédominante de NF- κ B est l'hétérodimère Rel A (p65)-p50 (431). L'hétérodimère p65-p50 est lié par I κ B. Les protéines I κ B se lient au dimère NF- κ B à travers de multiples répétitions d'ankyrine et inhibent leur activité de liaison à l'ADN (435). Elles sont rapidement dégradées en réponse aux stimuli d'activation de la voie NF- κ B. Lorsque le complexe IKK activé phosphoryle les protéines I κ B, celles-ci sont marquées (étiquetées) au niveau de la lysine K48 pour l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome 26S (426).

L'hétérodimère p65-p50 de NF- κ B peut alors se lier aux sites κ B des régions promotrices de ses gènes cibles, y compris les gènes codant les cytokines et les chimiokines pro-inflammatoires (436). Le complexe NF- κ B actif favorise l'expression d'I κ B α , ce qui constitue un important mécanisme de régulation par rétroaction négative assurant la fin de la réponse de NF- κ B (437). NF- κ B régule l'expression d'une gamme importante de protéines comprenant des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , l'IL-8, l'IL-6 et TNF α . Il régule également l'expression de molécules d'adhésion telles qu'ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule 1*) et VCAM-1 (*vascular cellular adhesion molecule 1*) et d'enzymes inductibles telles que l'iNOS (oxyde nitrique synthase inductible) qui intervient dans la réponse immunitaire innée contre des agents pathogènes (426).

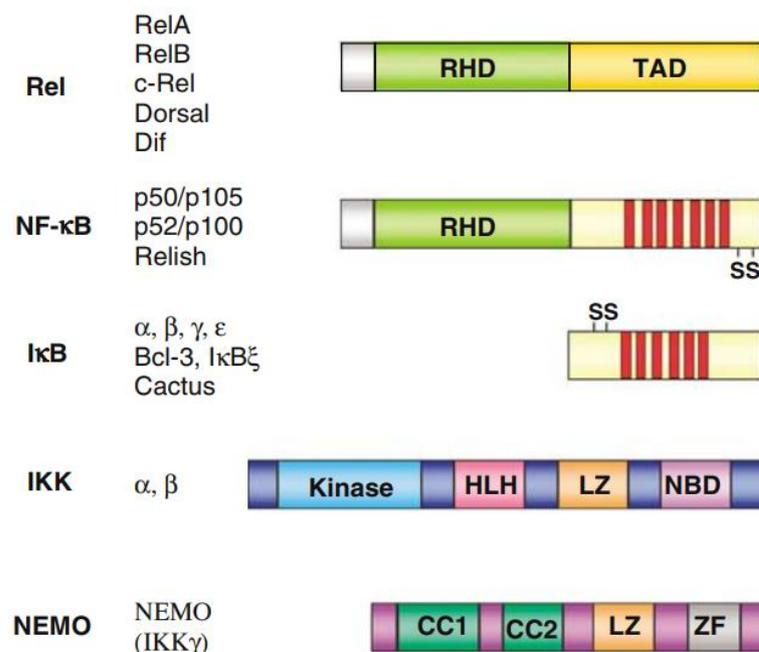


Figure 21. Structure des protéines de signalisation de NF-κB. Les structures générales des deux sous-familles Rel et NF-κB des facteurs de transcription de la famille NF-κB sont présentées en haut. Tous possèdent un domaine de liaison à l'ADN ou de dimérisation conservé, appelé RHD pour domaine d'homologie Rel (RHD), qui possède également des séquences importantes pour la localisation nucléaire et la liaison à l'inhibiteur IκB. La partie C-terminale des protéines Rel possède un domaine d'activation transcriptionnelle (TAD). En revanche, la partie C-terminale des protéines de la sous-famille NF-κB possède un domaine inhibiteur contenant des répétitions d'ankyrine (barres rouges), qui peuvent être éliminées par protéolyse. Comme le domaine C-terminal des protéines NF-κB, les protéines IκB indépendantes consistent principalement en des répétitions d'ankyrine et plusieurs (IκBα, IκBβ, IκBε, IκBγ) ont deux résidus sérine (S) N-terminaux qui servent des sites de phosphorylation d'IKK, et marquent la protéine pour l'ubiquitination et la dégradation. En bas, sont représentés les structures générales de IKKα et β (domaine kinase ; HLH, *helix-loop-helix* ; LZ, *leucine zipper* ; NBD, domaine de liaison à NEMO) et de NEMO (CC, *coiled coil* ; LZ, *leucine zipper* ; ZF, doigt de zinc) (431).

III.1.1.2. Voie de signalisation indépendante de MyD88

NF-κB et AP-1 peuvent également être activés par une voie indépendante de MyD88, impliquant la protéine adaptatrice TRIF contenant un domaine TIR avec lequel la protéine TRAM agit comme un adaptateur de pontage entre TRIF et le récepteur TLR (Figure 20) (438). TRIF interagit avec RIP1 (*Receptor Interacting Protein 1*) après recrutement de celle-ci (439). Cette dernière protéine interagit avec le domaine C-terminal de TRIF et la région N-terminale contenant des motifs de liaison TRAF6. La polyubiquitination de RIP1 entraîne la formation d'un complexe avec TRAF6 et TAK1 (440). Comme dans la signalisation dépendante de MyD88, TAK1 active ensuite le complexe IKK et MAPK mentionné précédemment. Cependant, la signalisation indépendante de MyD88 conduit également à l'activation de l'IRF3 (*Interferon Regulatory Factor 3*) membre de la famille IRF de facteurs de transcription. TRIF est d'abord recruté auprès du récepteur, ce qui conduit au recrutement de TRAF3 (440). Cela entraîne ensuite le recrutement et l'activation de TBK1 (*Tank Binding Kinase 1*) et d'IKK inductible également nommé IKKε. NAP1 (*NF-κB activating kinase associated protein 1*) joue

également un rôle dans le recrutement de ces kinases (441). TBK1 et IKK ϵ phosphorylent à leur tour IRF3 au niveau des résidus sérine/thréonine clés dans sa région C-terminale (442). La phosphorylation de l'IRF3 favorise sa dimérisation et sa translocation nucléaire permettant ainsi une interaction avec les co-activateurs transcriptionnels CBP/p300 (*cAMP responsive element binding protein*) (443). CBP/p300 acétyle des homodimères de IRF3, ce qui provoque un changement de conformation qui démasque son domaine de liaison à l'ADN (444). IRF3 se lie à la région promotrice des gènes codant notamment les interférons de type I ou III.

III.2. La réponse innée contre *C. difficile*

L'épithélium intestinal constitue une barrière fonctionnellement interactive, cruciale pour le développement de la réponse immunitaire innée. Les acteurs clés de l'immunité innée sont les cellules épithéliales intestinales et les cellules immunitaires intestinales telles que les macrophages, les monocytes, les mastocytes, les cellules lymphoïdes innées (LCI) et les cellules dendritiques. Les ICD sont caractérisées par une réponse inflammatoire intestinale aiguë avec infiltration de neutrophiles dans la muqueuse colique due aux activités indépendantes des toxines et d'autres composants bactériens (48) (Figure 22).

III.2.1. Réponse aux toxines TcdA et TcdB

Les toxines TcdA et TcdB activent les cascades de signalisation inflammatoires et induisent la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires dans les cellules épithéliales intestinales et cela indépendamment de l'activité glycosyltransférase (445). Ainsi, TcdA et TcdB induisent la production d'interleukine-8 (IL-8), un puissant chimio-attractant de neutrophiles agissant par plusieurs mécanismes (446). Cette production est médiée, en partie, par l'activation de la voie des MAPKs qui, à leur tour, activent les voies de signalisation de NF- κ B et AP-1 (447,448). La production d'IL-8 est également déclenchée par le stress cellulaire et la libération d'UDP - un signal de danger putatif et un ligand du récepteur P2Y6 - induits par TcdA et TcdB ou TcdB seule (445). TcdA et TcdB induisent également la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (449). Il a été ainsi montré que TcdA induit une altération des fonctions mitochondriales et une génération des ROS, entraînant à leur tour d'une part l'activation de NF- κ B et d'autre part la voie MAPK p38 activant la production de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) et la sécrétion de prostaglandine E2 (PGE2), lesquelles augmentent la production d'IL-8 par les colonocytes humains (450,451). D'autres cytokines et chimiokines peuvent être produites par les cellules épithéliales intestinales après l'exposition aux toxines dont MIP-2 (*macrophage-inflammatory protein-2*), GRO (*growth-related oncogen*) et MCP-1

(CC chemokine monocyte chemo-attractant protein 1)(452–454). L'ensemble de ces molécules favorise le recrutement local des neutrophiles et d'autres cellules immunitaires ainsi que la production de défenses.

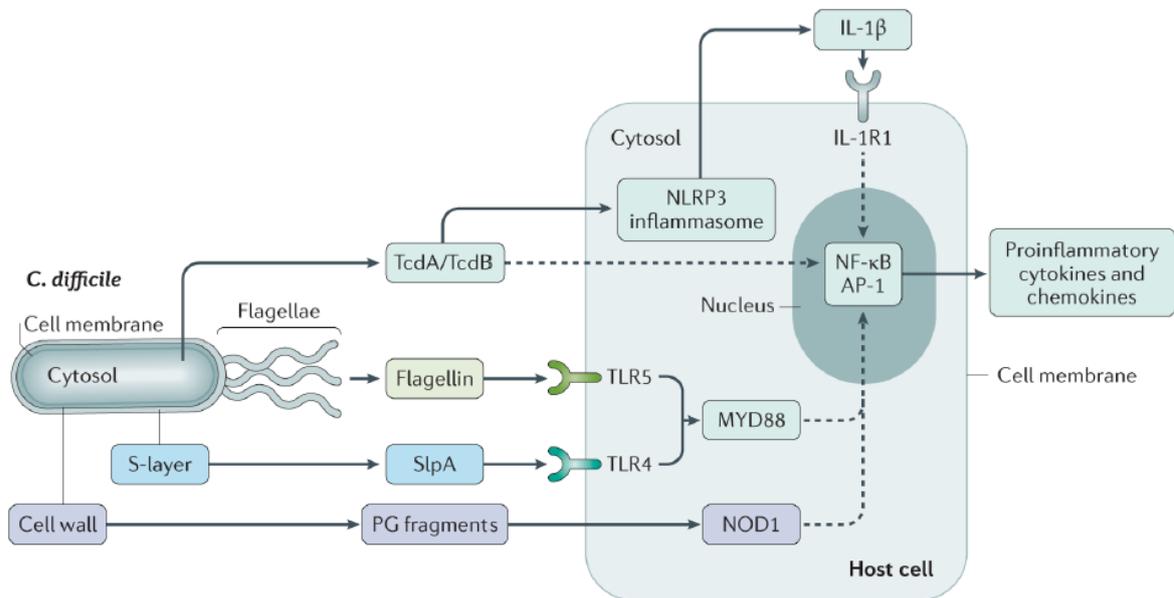


Figure 22. Réponse immunitaire innée des cellules hôtes dirigée contre *C. difficile*. *C. difficile* induit une réponse immunitaire innée via au moins quatre effecteurs différents, et conduisant à l'induction de la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires via les facteurs de transcription NF-κB et AP-1. Les grandes toxines clostridiales, TcdA et TcdB, agissent à travers des voies dépendantes et indépendantes de l'inflammasome NLRP3 (contenant des domaines NOD, LRR et pyrin). La protéine de la couche S (SlpA) et la flagelline agissent via des voies dépendantes de MyD88 via les récepteurs TLR4 et TLR5, respectivement. La voie d'induction dépendante du récepteur intracellulaire NOD1 pourrait être également activée par reconnaissance des fragments de peptidoglycane (PG) dérivés de la paroi cellulaire de la bactérie. Les lignes en pointillés indiquent les effets indirects. IL-1R1, IL-1 receptor type 1 (2).

Les toxines TcdA et TcdB peuvent activer différentes cellules immunitaires dans la muqueuse intestinale, comme par exemple les mastocytes et les monocytes, conduisant à une deuxième vague de libération des molécules pro-inflammatoires et de recrutement des neutrophiles. Ainsi, TcdA active la voie des MAPKs dans les monocytes induisant une production accrue d'IL-8 et la nécrose cellulaire avant la glycosylation de Rho (455). De même, TcdB active la voie des MAPKs dans les mastocytes, ce qui augmente la production de prostaglandines et donc la libération de l'IL-8 (456).

Les deux toxines activent également l'inflammasome. L'inflammasome est un complexe multiprotéique constitué de protéines sensorielles telles que les NLRPs (*nucleotide-binding domain leucin-rich repeat containing proteins*), des protéines adaptatrices dont ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), ainsi que des protéines contenant un domaine d'activation et de recrutement de la caspase (CARD) et des protéines effectrices (pro-caspases). Sa formation est déclenchée par des agents pathogènes ou des signaux de danger et son induction conduit à la formation de caspases actives, qui clivent la pro-IL-1β et la pro-IL-18 sous leurs formes bioactives.

L'IL-1 β participe à la génération de réponses systémiques et locales à l'infection en générant de la fièvre, en activant les lymphocytes et en favorisant l'infiltration des leucocytes aux sites d'infection. L'IL-18 pour sa part induit la production d'IFN- γ et contribue à la polarisation des cellules Th1 (T-helper1) (454,457,458).

III.2.2. Réponse aux protéines de la couche S

Les protéines de la couche S jouent un rôle d'immunomodulation de la réponse de l'hôte contre *C. difficile* et ne semblent pas être impliquées dans la sévérité de l'infection. Il a été montré que les SLPs induisent la libération de taux élevés des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-6 dans des monocytes humains, ainsi que la maturation des monocytes dérivés des cellules dendritiques (MDCD). Les MDCDs matures produisent ensuite la cytokine pro-inflammatoire IL-12p70 en faible quantité et en même temps une autre cytokine anti-inflammatoire l'IL-10 en quantité beaucoup plus importante, ce qui oriente vers une réponse immunitaire Th2 non inflammatoire, maintenant ainsi l'homéostasie du système immunitaire intestinal (459,460). Il a été également montré que les SLPs activent les macrophages murins, suggérant que ces protéines sont importantes dans la clairance de l'infection à *C. difficile* (461).

Une autre étude a montré que les SLPs sont reconnues par le TLR4 (225). Les SLPs activent les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse ou *bone-marrow-derived dendritic cells* (BMDC) qui produisent ainsi l'IL-12, IL-23 et l'IL-10 pour des réponses respectivement Th1, Th17 et Tr1. Les SLPs induisent également la maturation des cellules dendritiques. Ces effets n'ont pas été observés dans les BMDCs des souris KO TLR4^{-/-}, ou sont inhibés par les inhibiteurs de la protéine p38, indiquant que les SLPs interagissent avec le TLR4 et activent la voie de signalisation p38 des MAPKs (225). Les auteurs ont également montré que les SLPs intactes, contenant les deux protéines HMW-SLP et LMW-SLP, sont nécessaires à l'interaction avec le TLR4. De plus, les souris n'exprimant pas le récepteur TLR4 ou la protéine MyD88 sont plus susceptibles à l'ICD. L'ensemble de ces résultats indiquent que les SLPs activent l'immunité innée et adaptative via un mécanisme dépendant du TLR4 (462).

III.2.3. Réponse aux flagelles

D'une manière générale, deux principales cellules sentinelles sont ciblées par l'interaction de la flagelline avec le récepteur TLR5 : les cellules épithéliales intestinales et les cellules dendritiques. Le TLR5 reconnaît les monomères de flagelline qui peuvent être sécrétés lors de l'assemblage flagellaire, ou provenant de filaments flagellaires désagrégés à partir de bactéries viables ou délivrés après lyse bactérienne. Le TLR5 est capable de reconnaître la flagelline d'une grande diversité de bactéries

incluant *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Pseudomonas spp.*, *Listeria spp.*, *Legionella spp.*, *Clostridium spp* et *Vibrio spp*. En effet, TLR5 reconnaît une région conservée présente à la surface des monomères de flagelline mais qui est masquée une fois la flagelline polymérisée. Ce motif reconnu se situe dans une région hautement conservée présente sur les extrémités N et C-terminales et qui serait nécessaire à la polymérisation de la flagelline. Cependant, la flagelline de certains flagelles fonctionnels et mobiles n'est pas reconnue par le TLR5. C'est le cas de la flagelline de *Helicobacter pylori*, de *Campylobacter jejuni* et de *Bartonella bacilliformis*. Cette absence de reconnaissance de la flagelline par le TLR5 est due à une modification des acides aminés 89-96 de la région N-terminale de la flagelline. Afin de conserver des flagelles mobiles, des modifications compensatrices d'acides aminés d'autres régions de la flagelline ont été observées chez ces espèces citées (463).

Cependant, il n'a pas été bien élucidé comment les récepteurs TLR5 distinguent la flagelline des bactéries pathogènes et celle des bactéries commensales. Dans le côlon, la plupart des récepteurs TLR5 sont localisés du côté basolatéral des cellules épithéliales. Par conséquent, la détection épithéliale de la flagelline reposerait sur le fait que des bactéries soient capables de délivrer la flagelline à la surface basolatérale à la suite de la rupture de la barrière épithéliale ou de pénétrer l'épithélium à travers différents mécanismes d'invasion (464). Le TLR5 active la voie de signalisation dépendante de la molécule adaptatrice spécifique aux récepteurs TLRs MyD88 décrite plus haut (Voir chapitre III.1.1.1. Voie de signalisation dépendante de MyD88), qui active en aval la voie des MAPKs (ERK, p38 et JNK) et de NF- κ B, activant à leur tour la transcription des gènes impliqués dans l'immunité innée et adaptative. Yoshino et al. ont montré dans des cellules rénales transfectées par le TLR5 et les lignées de cellules intestinales humaines HT29 et Caco-2 que la flagelline purifiée de *C. difficile* induit l'activation de p38 MAPK et de NF- κ B et déclenche la production d'IL-8 et de CCL20. La production d'IL-8 et de CCL20 induite par la flagelline est significativement inhibée dans les cellules traitées par les anticorps anti-TLR5, montrant que la production d'IL-8 et de CCL20 induite par la flagelline de *C. difficile* est médiée par TLR5. Un prétraitement des cellules par la toxine TcdB augmente la production de cytokines induite par la flagelline, ce qui suggère que la rupture des jonctions serrées des cellules épithéliales intestinales par TcdB pourrait permettre à la flagelline d'atteindre le pôle basolatéral des cellules et faciliter son interaction avec le récepteur TLR5. Ces auteurs ont conclu que la flagelline de *C. difficile* pouvait jouer un rôle dans la pathogenèse de l'ICD (224).

Notre groupe de recherche a également utilisé deux modèles de lignées cellulaires différentes pour mieux caractériser les effecteurs et les médiateurs impliqués dans les voies de signalisation induites par l'interaction TLR5-flagelline de *C. difficile*. Nous avons confirmé que les flagelles (plus particulièrement la flagelline FliC) de *C. difficile* interagissent avec le récepteur TLR5 dans une lignée

de cellules rénales épithéliales canine Madin-Derby (MDCK) transfectées par TLR5 (MDCK-TLR5) et dans les cellules Caco-2 (465). La souche hypervirulente et épidémique R20291 flagellée de *C. difficile*, ainsi que sa flagelline recombinante, mais pas le mutant FliC- non flagellé, induisent la synthèse de l'IL-8. En outre, nous avons démontré, grâce à des expériences d'inhibition avec, soit des inhibiteurs chimiques des voies MAPK et NF- κ B, soit des siRNAs (*small interfering RNA*), que l'interaction de la flagelline avec TLR5 activait principalement la voie NF- κ B et, dans une moindre mesure, la voie des MAPK. Cela a été confirmé par des études de transcriptomiques dans des cellules Caco-2 montrant que les gènes codant l'IL-8, TNF α , CCL2, CXCL10 et CSF3 étaient fortement surexprimés. D'une manière intéressante, les gènes codant les protéines de la famille Rel, telles que les sous-unités p105 et p100 de la protéine NF- κ B (NFkB1 et NFkB2) et c-Rel (REL), étaient également surexprimés (465).

Par ailleurs, Jarchum et al. ont démontré que l'administration intrapéritonéale de la flagelline de salmonelle purifiée protège des souris des colites provoquées par *C. difficile* et maintient l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale (466). L'administration prophylactique de la flagelline retarde au début la dissémination de *C. difficile* dans le côlon, réduit l'apoptose des cellules épithéliales intestinales et préserve la fonction de la barrière intestinale. Dans cette expérience, la flagelline de salmonelle a été administrée avant, pendant et après l'infection par *C. difficile* et pourrait interagir avec le TLR5 basolatéral, conduisant à une défense immunitaire innée préliminaire, empêchant *C. difficile* de perturber l'épithélium. Ainsi, l'administration exogène de composants bactériens stimule le système immunitaire inné conduisant à la régulation positive du mécanisme de défense de l'hôte (466).

Dans notre travail de thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux mécanismes de régulation de la réponse inflammatoire induite spécifiquement par la flagelline de *C. difficile*, mais également par la bactérie entière. Nous nous focaliserons sur l'un des mécanismes de régulation importants des voies de signalisation des récepteurs TLRs qui est la régulation par les microARN et que nous détaillerons dans le chapitre IV.

III.3. La réponse immunitaire adaptative contre *C. difficile*

L'importance de la réponse immunitaire adaptative pouvant influencer l'issue de la colonisation et de l'ICD est discutée depuis de nombreuses années (467–469), mais les relations individuelles entre les classes d'immunoglobulines (Ig) et les facteurs de virulence bactérienne dans les ICD n'ont été définies que récemment. Une première infection par *C. difficile* favorise la libération de cytokines

spécifiques, notamment l'IL-10 et IL-4, qui stimuleraient la maturation des cellules B naïves en cellules plasmiques productrices d'Ig et en cellules B mémoire spécifiques (225). Il semble que ce défi immunitaire initial se produit dans la petite enfance, puisqu'environ 50 à 70 % des adultes en bonne santé ont des anticorps sériques IgG et IgA détectables contre les toxines de *C. difficile* (470–473).

Certaines classes d'immunoglobulines sont plus importantes que d'autres dans la médiation de l'immunité humorale contre *C. difficile*. Les IgA jouent un rôle essentiel dans l'immunité muqueuse et devraient jouer un rôle protecteur contre les antigènes de *C. difficile* dans la lumière intestinale. Les faibles taux d'IgA fécales et la réduction des cellules productrices d'IgA dans le côlon associées à la muqueuse intestinale se sont avérées être associées à des symptômes prolongés de l'ICD et à une récurrence de l'infection (473,474).

Les IgM sont les anticorps sériques les plus précoces à répondre à l'infection et il a été montré que les patients présentant des concentrations élevées d'anticorps IgM sériques contre les antigènes des toxines TcdA, TcdB et des autres protéines bactériennes dans les trois jours suivant l'apparition de la diarrhée semblent n'avoir qu'un épisode unique de l'infection (sans récurrence) (475). Les patients présentant une faible réponse IgM contre les SLPs au troisième jour après le début de la diarrhée ont montré un risque de récurrence 25 fois supérieur à celui des patients présentant une forte réponse IgM anti-SLPs (194).

Il a été également montré qu'une réponse élevée en IgG contre les toxines de *C. difficile* et les protéines de surface au moment de la colonisation protège contre le développement de l'ICD (476–478). Une fois qu'une ICD symptomatique est apparue chez le patient, les réponses sériques en IgG contre TcdA, TcdB et contre d'autres antigènes en dehors des toxines au douzième jour de la diarrhée étaient plus élevées chez les patients présentant un seul épisode d'ICD comparé aux patients ayant présenté une récurrence (475). Cependant, une réponse spécifique de l'IgG à la SLP ne s'est pas révélée protectrice contre la récurrence (194). Les protéines flagellaires de *C. difficile* FliC et FliD et les protéines associées à la surface Cwp66 et Cwp84 se sont également révélées immunogènes. Des anticorps dirigés contre ces protéines ont été détectés après le diagnostic d'une ICD et pendant les 2 semaines suivantes (324). La déficience dans certaines sous-classes d'IgG (IgG2 et IgG3) s'est également avérée être liée à la récurrence de la maladie (479).

Bien que les lymphocytes T et B ne contribuent pas à la résolution de la phase aiguë de l'ICD chez la souris, les données cliniques indiquent que les réponses immunitaires adaptatives peuvent avoir des effets protecteurs (477). Le rôle des cellules T est moins bien compris. Les souris présentant un complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), dépourvues de cellules T CD4 +,

présentent une infection aiguë inchangée, mais la production d'anticorps spécifiques à la toxine et la protection contre une infection secondaire par *C. difficile* sont inférieures à celles des souris sauvages (480). D'une manière intéressante, même chez les souris complètement immunocompétentes, la colonisation par *C. difficile* peut persister après l'infection initiale et la récupération, ce qui suggère que la fonction principale du système immunitaire est de limiter et de réparer les lésions de l'intestin induites par *C. difficile* (480–482). Par ailleurs, une réponse naturelle élevée en anticorps antitoxines ne protège pas toujours contre les ICD symptomatiques.

IV. Les microARN

IV.1. Généralités

En 1990, le premier phénomène de type Interférence par les ARN est découvert par hasard chez une plante, le pétunia (483). Les chercheurs, en introduisant des copies supplémentaires du gène de la chalcone synthase (CHS), pensaient renforcer la couleur violette des pétunias. Or, les fleurs obtenues se sont avérées au contraire blanches ou partiellement blanches et le niveau d'ARNm de la CHS cinquante fois inférieur à celui des fleurs sauvages. Ce mécanisme, encore incompris, est alors appelé « co-suppression » puisque les deux copies du gène (endogène et transgène) semblent interagir de manière inverse en se « co-supprimant » (483). Un autre résultat étonnant a été obtenu ensuite par Guo et Kemphues en 1995 qui voulaient inhiber l'expression d'une protéine dans les gonades de *Caenorhabditis elegans* par la transfection d'un ARN anti-sens, en supposant qu'il allait s'hybrider à l'ARNm de la protéine et inhiber ainsi son expression, et un ARN sens comme contrôle négatif. De manière surprenante, le contrôle négatif a également inhibé l'expression de la protéine (484). Ces résultats n'ont été expliqués qu'en 1998 avec la première description du mécanisme d'interférence ARN (RNAi) chez *C. elegans*, qui consiste en une inhibition spécifique de l'expression des gènes endogènes par la transfection d'ARN double brin (ARNdb) homologue au gène cible mais pas par l'ARN simple brin (485). Les résultats obtenus auparavant étaient dus à des produits secondaires minoritaires soit de la production de l'ARN anti-sens (activité ARN polymérase non spécifique) soit à une faible transcription de l'ARN anti-sens pouvant former un ARNdb avec l'ARN sens. Ultérieurement, il a été purifié à partir des extraits cellulaires de cellules de drosophile transfectées avec des ARNdb, des complexes ribonucléoprotéiques, avec une activité nucléase, nommés « RISC » pour *RNA-induced silencing complex* (486). Il a été également montré que les ARNdb transfectés sont clivés en petits fragments de 21-23 nucléotides par une RNase de type III appelée Dicer, et s'associent ensuite dans le complexe RISC avec des protéines de la famille Argonaute pour cliver leur ARNm cible

au centre de la région complémentaire de l'ARN anti-sens (487–489). Ces ARNdb étaient donc l'intermédiaire du principe de l'interférence ARN et sont nommés siRNA pour *short interfering RNAs*.

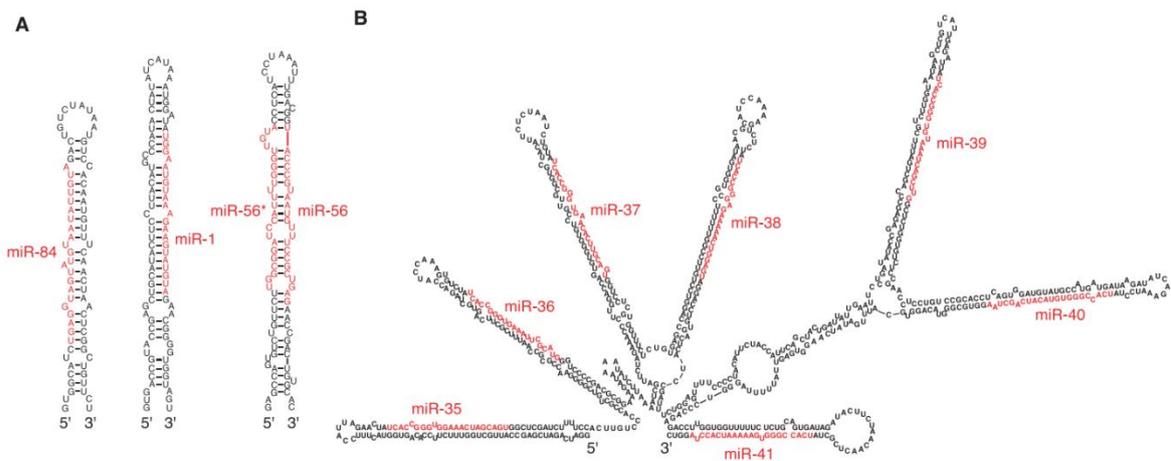


Figure 23. Exemples de miARN et leurs structures secondaires chez *Caenorhabditis elegans*. Structures secondaires de type tige-boucle prédites par « RNAfold » pour les précurseurs de miARN matures (en rouge) clonés chez *C. elegans* en 2001. (A) miARN individuels : miR-84 (un miARN de la même famille que let-7), miR-1, miR-56 et miR-56* (deux miARN clonés provenant des deux bras de la même structure tige-boucle) (B) Exemple d'un cluster de sept miARN, le cluster miR-35 à 41 (490).

Parallèlement à la découverte du mécanisme de RNAi, des recherches menées dans différents laboratoires sur des mutants du ver *C. elegans* ont permis de mettre en évidence l'existence de petits ARNs interférents endogènes, transcrits à partir du génome cellulaire : les micro-ARNs (miARN). Le premier miARN a été décrit en 1993 chez *C. elegans* (491). Il existe chez *C. elegans* quatre stades larvaires (L1 à L4) qui peuvent être caractérisés par l'état de division et de différenciation des cellules. Il a ainsi été montré que des mutations du gène *lin-4* entraînaient des divisions cellulaires caractéristiques du stade L1 à des stades plus avancés de développement. Au contraire, des mutations de *lin-14* entraînaient de manière prématurée des caractéristiques de stades larvaires plus avancés. Ruvkun et al. ont montré que *lin-14* codait une protéine nucléaire dont la diminution graduelle d'expression à la fin du stade larvaire L1 initiait le passage au stade L2 (492). Les phénotypes opposés des mutants de *lin-4* et *lin-14* avaient déjà permis à Victor Ambros de proposer que *lin-4* soit responsable de l'inhibition de *lin-14* (493). En 1993, son équipe montre que le gène *lin-4* ne code pas une protéine mais deux transcrits de petite taille (environ 61 et 22 nt), dont une partie de la séquence est partiellement complémentaire à des séquences contenues dans le 3'UTR «*Untranslated region*» (ou région non traduite) de l'ARNm de la protéine *lin-14* (494). Au même moment, Whightman et al. montrent que la région 3'UTR de *lin-14* est suffisante à sa régulation par *lin-4* au niveau posttranscriptionnel (495). Il est ensuite montré que c'est une interaction directe par

un appariement partiel antisens du petit ARN lin-4 avec les séquences contenues dans le 3'UTR de l'ARNm de lin-14 qui est responsable de l'inhibition de lin-14 au moment de la traduction, initiant ainsi le passage des stades larvaires L1 à L2 (492,496). D'autres miARN ont été ensuite découverts chez *C. elegans*, dont let-7 et des homologues dans d'autres organismes y compris les mammifères et une structure de type tige-boucle ou épingle à cheveux du précurseur conservé (Figure 23) (490,497,498). On compte aujourd'hui plus de 2600 miARN humains et 2000 miARN murins identifiés, séquencés et répertoriés dans la base de données miRBase (www.mirbase.org). Les miARN humains et murins sont bien conservés avec plus de 78 % d'homologie. Cependant, il existe une variation dans le niveau d'expression tissulaire des miARN entre la souris et l'homme (499).

Les miARN sont donc définis comme des petits ARN naturels de 21 à 24 nucléotides non codants, responsables d'une régulation post-transcriptionnelle des gènes, en guidant une protéine nommée « Argonaute » (AGO) à un ARNm cible. Ils sont nommés en utilisant le préfixe « miR » pour les miARN matures et le préfixe « mir » pour les précurseurs. Ce préfixe est suivi d'un numéro d'identification unique (miR-1, miR-2, ...). Les numéros d'identification sont attribués de manière séquentielle, ainsi un numéro identique pourra être donné pour des miARN identiques mais présents chez différents organismes. Pour les miARN possédant des séquences paralogues, qui se distinguent par seulement une ou deux bases différentes, on ajoute à leur nom un suffixe composé d'une lettre minuscule (miR-10a, miR-10b, ...), alors que, pour les miARN possédant des séquences identiques et qui ne se distinguent que par une structure en boucle à cheveux différente, on ajoute à leur nom un suffixe formé d'un numéro (mir-281-1, mir-281-2, ...) (500).

Il a été estimé que plus de 60 % des gènes humains codant des protéines sont régulés par des miARN (501). Des études fonctionnelles indiquent que les miARN sont impliqués dans plusieurs processus biologiques dont le développement, la différenciation, l'homéostasie, la réponse au stress, l'apoptose ou l'activation immunologique, chez l'Homme comme chez les animaux, les plantes et même chez certains virus à ADN (502). Ainsi, des perturbations dans l'expression des miARN sont associées à plusieurs pathologies humaines (cancers, pathologies cardiaques et hépatiques, entre autres).

IV.2. Biogenèse des miARN

IV.2.1. Transcription des gènes codant les miARN

Durant ces dernières années, les mécanismes de base de la biogenèse et certaines fonctions des miARN ont été élucidés (Figure 24) (503). D'une manière générale, les miARN proviennent de la

transcription de gènes indépendants (voie canonique) ou d'introns de gènes codant des protéines (voie alternative) (504,505). Environ 50 % des miARN humains appartiennent à des unités transcriptionnelles déjà connues et annotées du génome, et sont principalement trouvés dans les introns de ces gènes (506–508). Très rarement, des miARN pourraient être présents dans des exons des gènes comme dans le cas du précurseur du miR-155 qui se trouve dans un exon d'un ARN non-codant, préalablement connu sous le nom de BIC pour « *B-cell integration cluster* » (509). Un autre exemple, le miR-198 est codé dans un exon d'un gène codant la protéine FSTL1 (506). Par ailleurs, environ un tiers des miARN chez les mammifères sont regroupés en « clusters » et transcrits en un seul précurseur primaire polycistronique (510,511).

Les miARN appartenant aux introns des gènes codant des protéines sont co-transcrits avec leur gène hôte, ce qui a été montré par la corrélation entre l'expression de ces gènes et des miARN respectifs (506,512). Cependant, environ 30 % des miARN introniques peuvent être transcrits à partir d'un promoteur indépendant du gène hôte (513–515). Si la grande majorité des miARN matures sont aujourd'hui identifiés et annotés dans le génome, la compréhension de leur organisation génomique (comme la localisation exacte de leurs promoteurs) et de leurs mécanismes de transcription reste encore incomplète. Les miARN contenus dans des unités transcriptionnelles sont transcrits comme les ARNm par l'ARN polymérase II en un long transcrit primaire avec une structure en épingle à cheveux mesurant plusieurs kilobases, possédant une coiffe m7G en 5', polyadénylé et appelé pri-miARN (507,511,516,517).

IV.2.2. Maturation et clivage des pri-miARN en pré-miARN par Drosha et DGCR8

Dans la voie canonique, durant ou après leur transcription, les pri-miARN, sont clivés dans le noyau par un complexe protéique, nommé microprocesseur, composé de la protéine Drosha, une RNase de type III et de son partenaire DGCR8 (pour *DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8*), une protéine de liaison à l'ARNdb (518). Le clivage a lieu entre la structure en tige et l'ARN simple brin, libérant ainsi les précurseurs secondaires des miARN (pré-miARN). Ce clivage nécessite l'activité catalytique de deux protéines Drosha et DGCR8 ensemble puisque chaque protéine seule n'est pas capable d'effectuer ce clivage (519,520).

Le pri-miARN est caractérisé par une tige d'ARNdb d'environ 30 nt présentant des mésappariements, une boucle, et des fragments d'ARN simple brin de part et d'autre de cette structure tige-boucle. DGCR8 est une protéine qui possède un domaine WW (module qui intervient dans les interactions protéine-protéine par la reconnaissance de motifs peptidiques riches en proline et de sites phosphorylés de sérine / thréonine-proline) central, et deux dsRBD (*double-stranded RNA binding*

domain) en C-terminal. Les deux dsRBD sont nécessaires à la fixation aux pri-miARN et le domaine de liaison à Drosha se situe également en C-terminal.

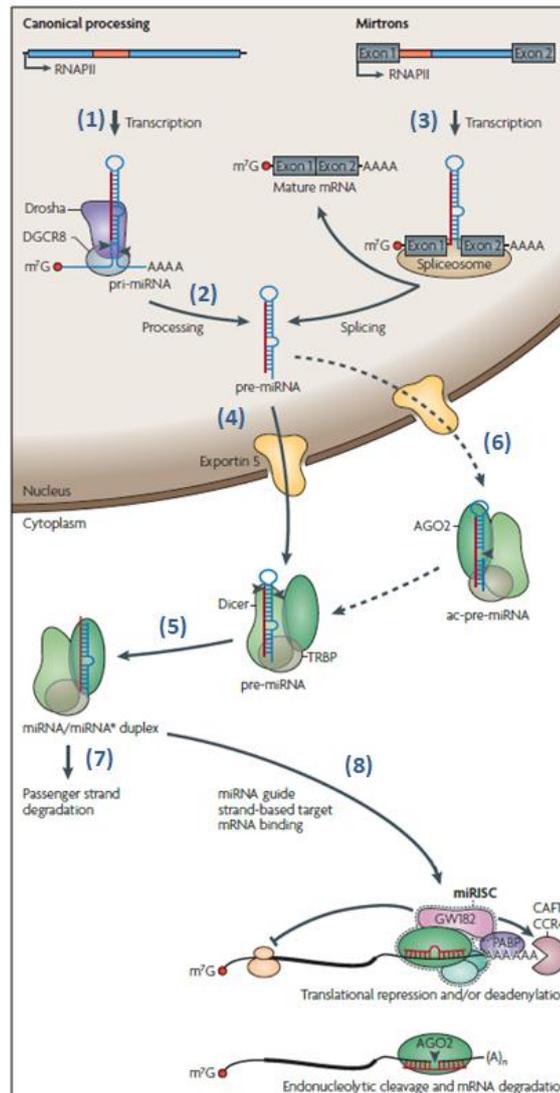


Figure 24. Biogenèse des miARN. En général, les miARN proviennent de la transcription des gènes indépendants (voie canonique) ou d'introns de gènes codant des protéines (voie alternative). Voie canonique : 1) transcription des précurseurs primaires pri-miARN par l'ARN polymérase II, 2) clivage par le complexe protéique Drosha (ARN polymérase III) et DGCR8 (protéine de liaison à l'ARN) entre la structure en tige et l'ARN simple brin, libérant les précurseurs secondaires pré-miARN, structures en tige-boucle de 50 à 70 nucléotides avec extrémité 3' libre reconnue par l'Exportine 5, responsable du transport vers le cytoplasme. 3) Certains pré-miARN sont produits à partir de très courts introns (mirtrons) lors de l'épissage, indépendamment de Drosha et DGCR8. 4) Dans les deux voies, les pré-miARN sont exportés du noyau. 5) Les pré-miARN sont clivés au niveau de leur boucle terminale par la RNase III cytoplasmique Dicer, formant l'hybride de 2 brins de miARN, miARN/miARN*. 6) Chez les mammifères, la protéine AGO2 pourrait soutenir l'action de Dicer par son activité endonucléase, en clivant l'extrémité 3' de certains pré-miARN, formant un autre intermédiaire de maturation ac-pré-miARN. 7) Ensuite, le brin guide de l'hybride miARN/miARN* est incorporé préférentiellement dans le complexe miRISC alors que le brin passager (miARN*) est libéré et dégradé. 8) Le miARN, ou « brin guide », va alors guider le complexe ribonucléoprotéique miRISC (miARN, protéine AGO2, GW182 et autres) à son ARNm cible, induisant soit l'inhibition de sa traduction soit sa désadénylation et sa dégradation. Modifiée d'après (503).

DGCR8 reconnaît la jonction entre les fragments d'ARN simple brin en 5' et 3' et l'ARNdb de la tige, région indispensable à la reconnaissance de la structure tige-boucle et à son clivage (518,521). La

fixation de DGCR8 au niveau de la jonction simple brin-double brin permettrait au domaine de liaison à l'ARNdb (dsRBD) de Drosha d'interagir transitoirement avec la tige, et positionnerait le centre catalytique de l'enzyme (constitué des deux domaines RNase IIIa et IIIb) de manière à ce qu'elle clive le duplex d'ARN 11 pb après la jonction (518). Différents facteurs auxiliaires pourraient s'associer à Drosha et DGCR8 et permettre de réguler l'activité du complexe ou de l'orienter vers certains pri-miARN spécifiques (519,522). Par exemple, les ARN hélicases p68 (DDX5) et p72 (DDX17) joueraient un rôle de facteurs auxiliaires en favorisant la sélection et la maturation de certains pri-miARN spécifiques (523). La protéine suppresseur de tumeur p53, induite en réponse à un dommage à l'ADN, est également capable de s'associer au microprocesseur d'une manière dépendante de p68 et p72, et favorise ainsi la maturation de certains pri-miARN spécifiques (524). D'autres facteurs sont capables au contraire de réguler négativement la maturation de certains pri-miARN par le microprocesseur. C'est le cas du complexe de facteurs nucléaires NF90-NF45 qui sont capables de se lier spécifiquement à certains pri-miARN, empêchant ainsi l'accès du microprocesseur (525). Certains pré-miARN sont produits à partir de très courts introns (mirtrons) lors de l'épissage, indépendamment de l'activité de Drosha et DGCR8.

IV.2.3. Exportation du pré-miARN dans le cytoplasme par l'exportine 5

Les pré-miARN possèdent une structure en tige-boucle de 50 à 70 nucléotides avec une extrémité 3' libre qui permet leur reconnaissance par l'exportine 5 (XPO5), permettant ainsi leur transport vers le cytoplasme (526). XPO5 est une protéine de la famille des karyophérines β , responsables du transport de protéines ou d'autres cargos du noyau vers le cytoplasme au travers du complexe de pore nucléaire (527–529). La fixation de XPO5 au pré-miARN est dépendante d'un co-facteur, la GTPase Ran sous sa forme GTP. L'hydrolyse de RanGTP en RanGDP dans le cytoplasme permet la dissociation du complexe et la libération du pré-miARN. XPO5 reconnaît la partie double-brin du pré-miARN ainsi que les 2 nt sortants en 3' (530). De plus, la formation du complexe pré-miARN/XPO5/RanGTP protège le pré-miARN de la dégradation par des nucléases (526,527,530).

IV.2.4. Clivage et maturation du pré-miARN

Une fois exportés dans le cytoplasme, les pré-miARN sont clivés au niveau de leur boucle terminale par une RNase III (ribonucléase) cytoplasmique nommée Dicer, formant ainsi un hybride composé de 2 brins de miARN (miARN/miARN*) d'environ 20 pb avec des extrémités 3' sortantes de 2 nt de chaque côté, caractéristiques des clivages successifs par les RNases III Drosha et Dicer (531). La protéine Dicer contient un domaine PAZ (nommé d'après les protéines PIWI, AGO et Zwiille, chez qui il est conservé). Le domaine PAZ est un module de liaison à l'ARN qui reconnaît l'extrémité 3' des siRNA et des miARN, de manière indépendante de la séquence. Le domaine PAZ s'associe à

l'extrémité de l'ARNdb et sépare les 2 domaines RNases III formant un dimère intramoléculaire par une hélice α (532,533). La distance qui sépare le domaine PAZ du site catalytique formé par les 2 domaines RNases III correspond à la longueur d'environ 22 nt des duplex miARN-miARN* générés par Dicer (533). Les brins 5' et 3' de la tige du pré-miARN sont clivés respectivement par les domaines RNase IIIa et RNase IIIb au sein du site catalytique qu'ils constituent (532). *In vivo*, Dicer interagit avec les protéines TRBP (*TAR RNA-binding protein*) et/ou PACT (*Interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein kinase activator A*), qui possèdent trois domaines dsRBD et semblent stabiliser Dicer et contribuer à la formation du complexe effecteur RISC (534,535). L'un des deux brins du duplex miARN-miARN*, communément appelé le brin « guide » ou miARN mature, est ensuite incorporé au sein d'un complexe miRISC (*miARN-induced silencing complex*). L'autre brin, miARN* ou brin « passager », est exclu du complexe RISC et éliminé. C'est la stabilité thermodynamique relative des deux extrémités des duplex de siRNAs et miARN qui semble déterminer la sélection de l'un des deux brins. Ainsi, le brin le plus faiblement apparié à son extrémité 5' est majoritairement incorporé (536,537). Cependant, certains pré-miARN donnent des miARN matures provenant des deux brins à une fréquence comparable (parfois distingués dans ce cas par la notation miR-x-3p, brin en 3', et miR-x-5p, brin en 5') (538–540). La notation miARN et miARN* est établie à partir du ratio entre les nombres de séquençages obtenus pour les deux espèces respectives, le miARN mature étant celui trouvé le plus abondamment (www.mirbase.org). Pourtant ce ratio varie fortement (entre 1 et plus de 100) en fonction du pré-miARN, et varie également en fonction du tissu considéré pour certains pré-miARN, indiquant que le brin « passager » miARN* est dans certains cas exprimé de manière significative (538,540,541). De plus, les miARN* exprimés sont fonctionnels et peuvent également induire la répression de cibles *in vivo* (538,539,542).

IV.2.5. Le complexe miRISC

Le complexe miRISC est un complexe ribonucléoprotéique caractérisé par la présence d'une protéine effectrice de la famille Argonaute et d'autres protéines, comme la protéine GW182 (*glycine-tryptophan protein 182 kDa*), et d'un miARN servant de guide en s'appariant à un ARN cible (Figure 25) (543). GW182 est une famille de protéines, composant des « corps cytoplasmiques » appelés corps P ou corps GW (*P-bodies Processing body* ou *GW-bodies*). Ces corps cytoplasmiques contiennent des enzymes de dégradation des ARNm et sont impliqués dans la dégradation et/ou le stockage des ARNm non traduits (544–548). Les protéines GW182 jouent un rôle clé dans la répression induite par les miARN, en interagissant par le biais de leurs répétitions GW (glycine-tryptophane) en N-terminal avec les protéines AGO ; l'interruption de cette interaction empêche la répression induite par les miARN (549–553). La fixation artificielle, sans miARN, de GW182 à un

ARNm dans des cellules de drosophile conduit à une répression de l'expression du transcrit, même en absence de AGO1, indiquant que GW182 agit en aval de AGO1 (549). De même, dans des cellules humaines, le domaine C-terminal des protéines TNRC6A-C (pour *Trinucleotide Repeat-Containing 6A, B and C*, homologues de GW182) suffit à la répression de la cible, alors que ce domaine n'est pas responsable de l'interaction avec AGO (554,555). L'ensemble de ces résultats suggère donc que la protéine AGO recrute GW182 au niveau du transcrit cible, puis la région C-terminale de GW182 agit en aval pour induire la répression traductionnelle et/ou la dégradation de l'ARNm.

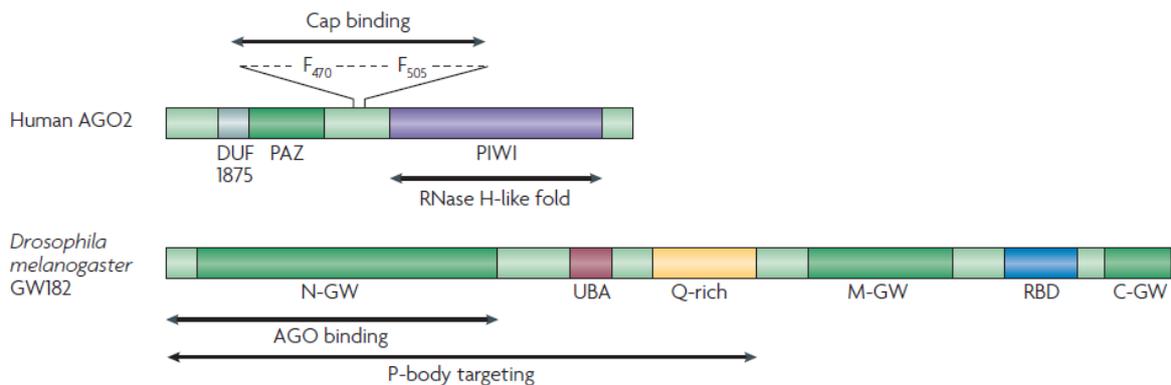


Figure 25. Organisation des domaines des protéines Argonaute et GW182. Les schémas représentent la protéine Argonaute-2 humaine (AGO2) et la protéine GW182 de *Drosophila melanogaster*, deux protéines largement caractérisées dans l'inhibition de l'expression des ARNm par les miARN. Le domaine RNaseH-like PIWI (*P-element induced wimpy testis*) est impliqué dans le clivage endonucléolytique de l'ARNm. La région séparant les domaines PAZ (*PIWI Argonaute Zwillie*) et PIWI de AGO2 contient deux acides aminés aromatiques (phénylalanines F470 et F505), dont la mutation empêche l'inhibition de la traduction. *D. melanogaster* n'exprime qu'une seule protéine GW182, mais il existe trois paralogues de GW182 chez les mammifères (connus sous le nom de TNRC6A-C). N-GW, M-GW et C-GW sont des régions enrichies en dipeptides de glycine (G)-tryptophane (W). Le domaine N-GW avec des peptides contenant des répétitions GW plus courtes s'est avéré être un médiateur de l'interaction des protéines GW182 avec le domaine PIWI des protéines AGO. La région s'étendant de l'extrémité N au domaine riche en glutamine (Q-rich) est responsable du ciblage de GW182 aux corps cytoplasmiques (P-bodies). DUF, domaine de fonction inconnue ; RBD, domaine de liaison à l'ARN ; UBA, domaine associé à l'ubiquitine ; Q, glutamine (543).

Il existe quatre protéines AGO chez les mammifères (AGO1-4). Alors que seule AGO2 possède une activité catalytique de clivage d'un ARNm cible lorsqu'elle est associée à un miARN parfaitement complémentaire à sa cible, toutes les protéines AGO sont capables de se lier avec la même affinité aux petits duplex d'ARNs (miARN), et les protéines AGO1-4 sont redondantes pour l'utilisation des miARN (556–558). Les protéines AGO possèdent trois domaines conservés (Figure 25). Le domaine PAZ (*Piwi-Argonaute-Zwillie*), que possède également Dicer, reconnaît et se fixe à l'extrémité 3' sortante du duplex siRNA ou miARN (556,559–562) ; le domaine MID constitue une poche de fixation du 5'-phosphate du duplex ; le domaine PIWI (*P-element induced wimpy testis* chez la *Drosophile*), qui adopte une conformation secondaire ressemblant à une RNase H, constitue le domaine

catalytique de certaines AGO (comme AGO2 chez les mammifères) (556,562–565). De nombreuses ARN hélicases dont Gemin3, DDX5 (ou ARN hélicase p68), MOV10 (ARN hélicase putative), ou encore RHA (RNA hélicase A), ont été trouvées associées aux complexes RISC et pourraient jouer un rôle dans la séparation des deux brins et l'élimination du brin «passager» (566–569).

IV.3. Mécanismes d'action des miARN

IV.3.1. Appariement à l'ARNm cible

La régulation exercée par les miARN est spécifique grâce à l'appariement du miARN mature contenu dans le complexe miRISC avec une séquence partiellement complémentaire située généralement dans la région 3'UTR de l'ARNm cible et appelée MRE pour « *miARN Response Element* » (Elément de réponse au miARN). Plusieurs modèles ou profils d'appariement différents ont été établis par des analyses expérimentales et informatiques (Figure 26). Le critère le plus important est un appariement parfait entre l'ARNm cible et les nucléotides 2-7 à l'extrémité 5' du miARN, qui constituent la *seed sequence* du miARN ou région de nucléation (région noyau) de l'interaction entre le miARN et l'ARNm cible. Ainsi, chez les métazoaires, cette région représente la séquence la plus conservée des miARN (570). De plus, des mutations dans la *seed sequence*, donnant lieu à des mésappariements ou des appariements bancals G-U « wobble », diminuent considérablement la répression de la cible (571–573). Plusieurs autres études valident également ce modèle, dont la validation fonctionnelle *in vivo* des prédictions *in silico* des cibles basée sur ce modèle d'appariement. Très rarement chez les animaux, des sites cibles fortement complémentaires au miARN avec un appariement parfait dans la région centrale peuvent entraîner un clivage de l'ARNm cible (574–576). La région 3' contient souvent un niveau minimal d'appariement, qui pourrait jouer un rôle dans la stabilisation de l'interaction du miARN avec sa cible mais il n'est pas suffisant à lui seul pour inhiber l'expression de l'ARNm cible. Cependant, un appariement supplémentaire au niveau des nucléotides 13-16 améliore la spécificité de l'interaction, et un appariement étendu en 3' compense dans certains cas un mésappariement dans la région noyau (573,577). Des logiciels de prédiction des cibles des miARN (miRanda, PicTar, TargetScan...) ont été développés sur la base des règles décrites ci-dessus, principalement celle de l'appariement parfait au niveau de la séquence noyau, ainsi que sur la conservation des MRE pour favoriser l'identification de sites fonctionnels sélectionnés au cours de l'évolution (578–580). Ils prédisent plusieurs dizaines à centaines de cibles pour un miARN donné mais elles n'ont pas

toujours une réalité biologique. Des validations expérimentales sont nécessaires dans chaque cas pour montrer qu'une cible prédite est bien une cible du miARN *in vivo*.

	Type d'appariement	Exemples validés
	A) Séquence noyau dominante ARNm 5'-----A NNNNNNA---3' miRNA 3'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5' noyau (nt 2-7 ou 2-8)	a) CDKN1A et miR-106b dans les cellules humaines (mammaires épithéliales) CDKN1A/p21 5'...AGAAGUAAACAGAU ^A GGCACUUUG...-3' miR-106b 3'-UAGACGUGACAGU ^U CGUGAAU-5' noyau (nt 2-8)
	B) 3'-supplémentaire ARNm 5'-----NNNNN A NNNNNNA---3' miRNA 3'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5' noyau	b) Grim et miR-2 chez <i>D. melanogaster</i> Grim 5'...GGCUCAAUCAAGCGCAUUGUGAUU...-3' miR-2 3'...CGAGGAGUUGGACCCACACUAAU...-5' noyau (nt 2-7)
	C) 3'-compensatoire (mésappariement dans la séquence noyau) ARNm 5'-----NNNNN A N N NNNNA---3' miRNA 3'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5' noyau	c) lin-41 et let-7 chez <i>C. elegans</i> lin-41 5'...UUUAUACAACCGUUCUAC ^A CUCA...-3' let-7 3'-UUGAUUUGUUGGAU-GAUG-GAGU-5' Mésappariement dans la séquence noyau
	D) Central ARNm 5'-----NNNNNNNNNNNN---3' miRNA 3'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5' noyau	d) GSTM3 et miR-21 dans les cellules humaines (HeLa) GSTM3 5'...AGAAGUUUUCAGUCUGAUAA ^A CUAUGA...-3' miR-21 3'-AGUUGUAGUCAGACUAUUCGAU-5'
	E) Étendu ARNm 5'-----NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN---3' miRNA 3'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5'	e) HOXB8 et miR-196a dans les embryons de souris HOXB8 5'...UUUCCCAACAACAUCAAACUGCCUAUUC...-3' miR-196a 3'-GGGUUGUUGUACUUGAUGGAU-5'

Figure 26 Appariements entre miARN et ARNm cibles. Types d'appariements possibles entre un miARN et un ARNm cible du plus courant (A) au moins courant (E) (colonne de gauche) et exemples validés expérimentalement avec la lettre correspondante en minuscule (colonne de droite). (A) Appariement principal au niveau de la séquence noyau (nt 2-7 ou 2-8) ; (B) Un appariement supplémentaire de minimum 3-4 pb généralement centré sur les nt 13-16 améliore l'appariement au niveau de la séquence noyau ; (C) Un appariement de minimum 4-5 pb généralement centré sur les nt 13-16 complète un mésappariement dans la séquence noyau ; (D) Appariement central de 11 nt minimum d'affilée qui peut permettre le clivage endonucléolytique par AGO2 ; (E) Appariement étendu qui peut permettre le clivage endonucléolytique par AGO2. (A, B et C) Un résidu adénosine est souvent retrouvé sur l'ARNm en face de la position 1 du miARN, et un résidu adénosine ou uracile est souvent retrouvé en face de la position 9 (en rouge). La pertinence de la distinction entre (A) et (B) reste à vérifier, des appariements en 3' étant très courants mais la validation expérimentale d'une cible se faisant toujours par des mutations dans la séquence noyau (581).

D'autres profils d'appariement ont été plus rarement décrits. De nouveaux MRE fonctionnels avec des appariements centraux parfaits de 11 nt minimum d'affilée (nucléotides 4-14 ou 5-15) et des appariements imparfaits au niveau de la séquence noyau et en 3' ont été récemment mis en évidence (576). Notons qu'un appariement étendu sur toute la séquence du miARN permettant un clivage de l'ARNm cible a été également décrit, même si, *in vivo*, la répression par clivage des ARNm cibles semble demeurer un mécanisme minoritaire (Figure 26) (581).

Chez les métazoaires, les MRE connus sont localisés généralement dans le 3'UTR, et plusieurs copies dans un même ARNm assurent une répression plus efficace (573). De plus, des MRE proches (10-40 nt d'écart) semblent agir de manière coopérative, avec des effets de répression de la cible plus importants que ceux attendus de la contribution de deux MRE indépendants (571,577,582,583). D'autres exemples montrent que certains miARN sont capables de réguler l'expression de gènes cibles via des MRE situés dans le 5'UTR. Curieusement, dans la plupart des cas, la fixation d'un miARN sur un MRE localisé dans le 5'UTR s'accompagne d'une activation de la traduction, contrairement à la répression normalement induite par les miARN (584–586).

Enfin, d'autres facteurs que l'appariement lui-même interviennent dans la reconnaissance d'une séquence cible par un miARN et dans sa fonctionnalité. Un de ces facteurs est l'accessibilité du MRE *in vivo*, qui peut être influencée par la structure secondaire de l'ARNm ou encore par l'association de protéines de liaison à l'ARNm, qui peuvent agir comme des modulateurs de l'effet des miARN (587–591). De plus, le contexte dans lequel se situe le MRE influence l'effet du miARN sur la cible. Des éléments de séquence non complémentaires au miARN mais présents à proximité dans le 3'UTR, comme une région riche en A/U à proximité, sont nécessaires ou améliorent dans certains cas la répression de la cible par le miARN (577,592–595).

Par ailleurs, un miARN donné peut avoir plusieurs cibles différentes, et une cible donnée peut être régulée par plusieurs miARN différents. Par exemple, il a été montré que la protéine p21 représente une cible validée expérimentalement pour plusieurs miARN dont les miR-20a, miR-17, miR-93 et miR-106a/b (596–598). Ainsi, l'activité combinée de ces miARN régule l'expression de p21 dans les cellules cancéreuses. En effet, les miARN constituent un réseau complexe, dont la combinaison de plusieurs miARN pourrait cibler un même ARNm. C'est la raison pour laquelle l'étude des miARN devrait considérer l'activité combinée de l'ensemble de miARN régulant une même cible (599). Par ailleurs, les interactions miARN-cibles dépendent du contexte cellulaire, et en particulier de la quantité respective de miARN et de transcrits cibles. De plus, la fixation d'un miARN sur un ARNm diminue la quantité disponible de ce miARN, ajoutant de la complexité au système (600).

IV.3.2. Régulation de l'expression de la cible

Compte tenu de la similarité des complexes miRISCs et la manière « simple » dont ils engagent leurs cibles, il semblerait que tous ces complexes fonctionnent par un mécanisme commun. Étonnamment, cette attente n'a pas été confirmée expérimentalement. Il existe maintenant des preuves sur l'existence de plusieurs modes de régulation médiée par les miARN, y compris l'inhibition de la traduction, la désadénylation et la dégradation des ARNm, et/ou la séquestration

de l'ARNm. Cependant, il n'est pas encore établi si ces différents mécanismes sont interdépendants (Figure 28).

IV.3.2.1. Inhibition de la traduction des ARNm

La traduction débute par la reconnaissance de la coiffe en 5'-terminal 7-méthylguanosine (m7G) de l'ARNm par eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor (eIF) 4E*), une sous unité du complexe d'initiation eIF4F qui contient également les sous-unités eIF4A et eIF4G. L'interaction d'eIF4G avec eIF3 facilite le recrutement de la petite sous-unité ribosomique 40S, qui commence alors le balayage de la région 5' à la recherche du codon d'initiation AUG ; l'association entre cette petite sous-unité 40S et la grande sous-unité 60S permet de former le complexe ribosomique 80S et de commencer l'élongation. eIF4G interagit également avec PABPC (*poly(A)-binding protein, cytoplasmic*), une protéine associée à la queue poly(A) en 3', ce qui permet de donner une conformation circulaire à l'ARNm, améliorant ainsi l'efficacité de la traduction, tout en protégeant l'ARNm de la dégradation (Figure 27) (601,602). Le mécanisme par lequel miRISC inhibe la traduction est controversé. Plusieurs études présentent des résultats indiquant un blocage de l'initiation de la traduction, tandis que d'autres études présentent des preuves concernant une répression à des stades post-initiation.

IV.3.2.1.1. Inhibition de l'initiation de la traduction

Plusieurs preuves sont en faveur de l'inhibition de la traduction des ARNm par les miARN au niveau de l'initiation de la synthèse protéique (Figure 28). Dans une étude, il a été montré qu'un miARN endogène réduit l'association de polysomes d'un rapporteur construit avec des sites cibles appropriés (603). Dans une autre étude, il a été rapporté que l'inhibition complète de la traduction nécessite à la fois la coiffe m7G en 5' et la queue poly(A) en 3', alors que des ARNm rapporteurs produits à partir d'un IRES «*Internal Ribosome Entry Site* », ne possédant pas de coiffe m7G ou ayant une coiffe non fonctionnelle (ApppN), ne sont pas efficacement réprimés par les miARN (604).

Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer l'inhibition de l'initiation de la traduction par les miARN. Plusieurs études ont montré que l'initiation de la traduction pourrait être inhibée par l'inhibition de la reconnaissance de la coiffe. Par exemple, une étude utilisant des gènes rapporteurs cibles de let-7 montre que l'inhibition induite par let-7 s'accompagne d'une diminution de l'association de l'ARNm cible avec le complexe ribosomique 80S. L'ajout en excès du complexe eIF4F lève l'inhibition induite par let-7, indiquant que la phase de reconnaissance de la coiffe est importante dans le processus d'inhibition de la traduction de l'ARNm cible (605).

D'autres études ont proposé, en revanche, que l'inhibition de l'initiation de la traduction est médiée par l'inhibition du recrutement de la sous-unité 60S ribosomale. Il a été ainsi montré que la protéine eIF6 et la sous-unité ribosomique 60S sont parmi les facteurs associés au complexe miRISC (534). eIF6 est une protéine impliquée dans la biogenèse et la maturation des sous-unités ribosomiques 60S et empêche l'association prématurée des sous-unités 60S et 40S. Son association au complexe miRISC au niveau de l'ARNm cible permettrait donc d'empêcher le recrutement de la sous-unité 60S et donc l'initiation de la traduction.

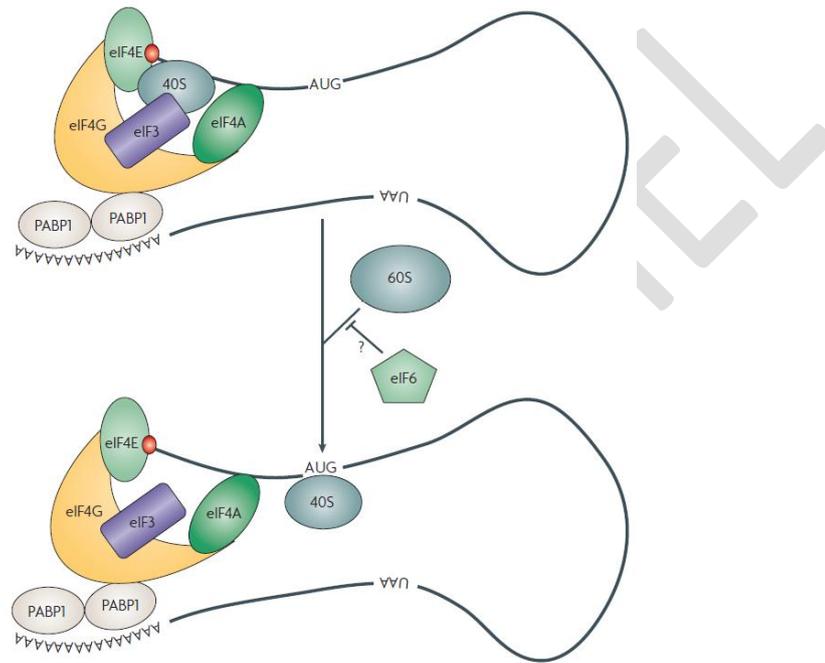


Figure 27. Etapes de la traduction de l'ARNm chez les eucaryotes. La traduction de l'ARNm comprend trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'initiation est l'étape la plus complexe. La traduction nécessite la participation d'au moins 10 facteurs d'initiation, dont beaucoup sont des complexes multi-sous-unitaires. L'initiation de la traduction de la plupart des ARNm cellulaires commence par la reconnaissance de la coiffe d'ARNm 5'-terminal 7-méthylguanosine (m7G) (représentée par le cercle rouge sur la figure) par la sous-unité 4E du facteur d'initiation eIF4F, qui contient également eIF4A (une hélicase à ARN) et eIF4G (une grande protéine multidomaine qui fonctionne comme un échafaudage pour l'assemblage du complexe d'initiation de la traduction). L'interaction de eIF4G avec un autre facteur d'initiation à plusieurs sous-unités, eIF3, facilite le recrutement de la sous-unité 40S, qui après reconnaissance du codon d'initiation AUG, va se lier à la sous-unité ribosomale 60S permettant de démarrer la phase d'élongation. Lorsque le ribosome rencontre un codon de terminaison, les facteurs de libération de la traduction interviennent dans le processus de terminaison, dans lequel les sous-unités ribosomales se dissocient à la fois l'une de l'autre et de l'ARNm. Une fonction importante de eIF4G est son interaction avec la protéine de liaison poly (A) 1, PABP1, associée à la queue poly (A). Cette interaction entraîne la circularisation de l'ARNm, qui stimule l'initiation de la traduction et éventuellement le recyclage des ribosomes. eIF6 est requis pour la biogenèse de la sous-unité 60S. et pourrait également servir de facteur d'initiation pour réguler la jonction de la sous-unité (543).

IV.3.2.1.2. Inhibition post-initiation de la traduction

Différents résultats, parfois très contradictoires avec ceux décrits précédemment, indiquent que l'inhibition de la traduction induite par les miARN se fait après l'initiation. Les premières analyses fonctionnelles des miARN ont été réalisées chez *C. elegans* : il a été constaté que l'abondance des

ARNm régulés par les miARN n'était pas substantiellement modifiée, mais l'abondance des protéines codées par ces ARNm était nettement réduite (496,606). De plus, les ARNm régulés semblaient être présents dans des polysomes et engagés dans des ribosomes impliqués dans l'élongation *in vitro* (496,606). Ces observations frappantes ont suggéré que la suppression de la production de protéines par les miARN a lieu par un mécanisme qui fonctionne après l'initiation de la synthèse des protéines. Dans une première étude, un ARNm régulé par un miARN dans des cellules HeLa a été retrouvé exclusivement dans les polysomes et associé avec des ribosomes compétents pour l'élongation (607). Dans une seconde étude, un ARNm rapporteur sensible à un miARN endogène était également présent dans les polysomes (608). Plusieurs résultats ont montré que ces polysomes traduisaient activement les ARNm, cependant, les polypeptides naissants n'ont pas été détectés par immunoprécipitation, suggérant que l'inhibition de l'accumulation des protéines est le résultat d'une dégradation co-translationnelle des protéines dont le mécanisme n'a pas été bien élucidé (Figure 28) (608). Dans une troisième étude, la traduction d'un gène rapporteur contenant une région 3'-UTR avec des sites cibles conçus avec une complémentarité imparfaite pour un miARN synthétique s'est révélée réprimée et l'ARNm associé avec des polysomes. Dans ce cas, les auteurs ont suggéré que le déficit de la production des protéines est dû à une terminaison prématurée de la traduction (détachement prématuré du ribosome favorisé par miRISC) (Figure 28) (609).

L'ensemble des études de l'inhibition de la traduction ont révélé des mécanismes distincts par lesquels la traduction peut être inhibée. D'une manière intéressante, des différences ont également été observées dans la capacité des miARN à supprimer la traduction promue par IRES : deux équipes ont trouvés que la synthèse des protéines dirigée par IRES n'a pas été affectée par le miARN, alors qu'une autre équipe a montré qu'elle était diminuée en réponse au miARN (603,604,609). L'interprétation la plus simple des résultats obtenus jusqu'ici est que l'inhibition de la traduction par les miARN peut se produire d'une manière dépendante ou spécifique d'un ARNm donné à des étapes distinctes du processus de traduction. Néanmoins, les caractéristiques des ARNm individuels et/ou des combinaisons ARNm-miARN qui dictent le mécanisme de répression restent à élucider.

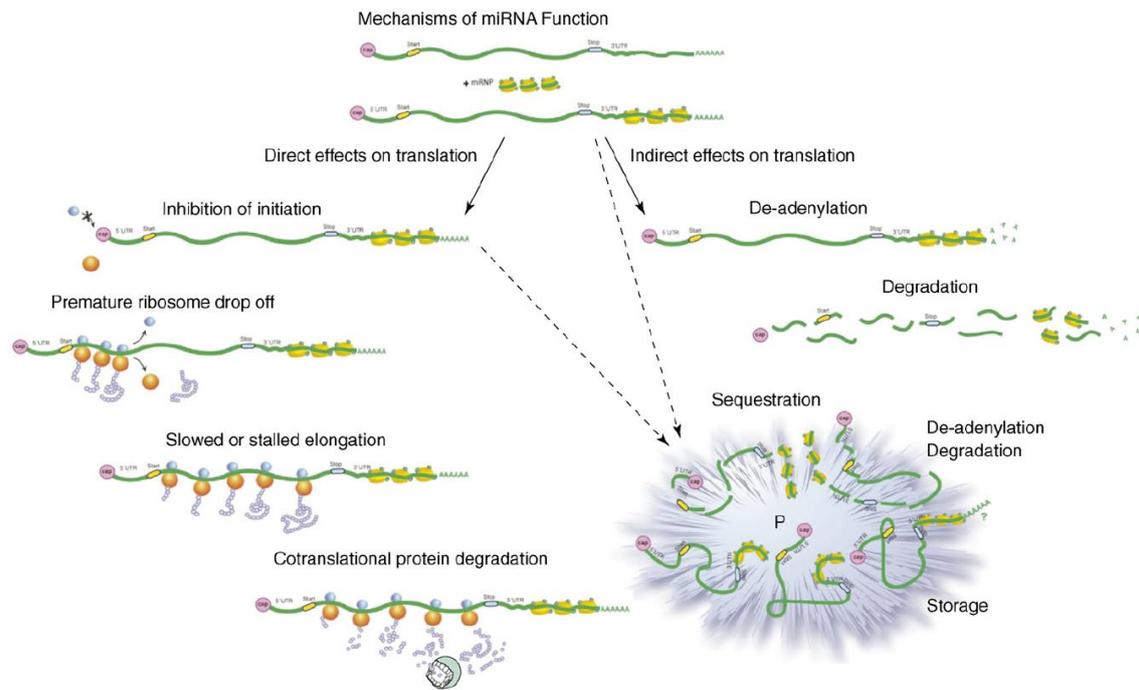


Figure 28. Mécanismes d'inhibition de l'expression des ARNm par les miARN. Les ARNm cibles sont reconnus par les miARN sous forme de complexes ribonucléoprotéiques (miRNPs), par complémentarité de séquence, généralement entre les miARN et les séquences dans la région 3'-UTR de l'ARNm. L'interaction entre le miRNP et l'ARNm peut avoir plusieurs conséquences. Celles-ci incluent des effets directs et indirects sur la traduction. Les effets directs se manifestent soit par l'inhibition de l'initiation de la traduction, soit par la prévention de l'association des ribosomes avec l'ARNm cible ou par inhibition de la traduction après l'initiation. Dans le cas de l'inhibition post-initiation - qui comprend la chute prématurée du ribosome, l'élongation ralentie, et la dégradation transcriptionnelle des protéines - l'ARNm inhibé semble être présent dans des polysomes, c'est-à-dire associé à plusieurs ribosomes. Outre les effets directs sur la traduction (ou l'accumulation de protéines), les miRNPs peuvent avoir d'autres effets sur les ARNm ciblés, notamment en favorisant la désadénylation, ce qui pourrait entraîner une dégradation. La désadénylation et la dégradation peuvent avoir lieu dans les corps P (désignés par P), qui sont des foyers cytoplasmiques enrichis en facteurs impliqués dans la dégradation des ARNm. Il est possible que les ARNm ciblés par les miARN puissent être inaccessible à la machinerie de traduction et dégradés ou stockés pour une utilisation ultérieure. Cependant, les ARNm ciblés pourraient être séquestrés comme conséquence de l'inhibition de l'initiation de la traduction (610).

IV.3.2.2. Désadénylation et dégradation des ARNm

Comme discuté dans la partie précédente, il a été initialement admis que la régulation médiée par les miARN a lieu principalement au niveau de la traduction et non au niveau de la dégradation de l'ARNm. Il est maintenant clair que cette idée n'est que partiellement correcte. Il existe de nombreux exemples de miARN déstabilisant leurs ARNm cibles. En effet, le mécanisme par lequel les miARN induisent la dégradation de l'ARNm est peut-être, malgré sa rareté, mieux compris que le mécanisme de l'inhibition de la traduction (Figure 28). La transfection des cellules par des miARN a permis de prouver la déstabilisation des cibles par les miARN. La présence d'un tel miARN réduit l'abondance de nombreux ARNm, dont la plupart contenaient des sites cibles pour ce miARN (611). En outre, l'examen de plusieurs cibles de certains miARN chez *C. elegans* a révélé que leur

quantité est également réduite de manière dépendante du miARN (612). Le principe de l'induction de la dégradation des ARNm par les miARN a permis la création et l'utilisation des micro-array d'ARNm pour l'identification des cibles des miARN (549,611,613,614). Il n'existe pas de méthode analogue à haut débit pour identifier les cibles régulées strictement au niveau de la traduction. Comme déjà indiqué, un appariement parfait entre le miARN et sa cible peut induire un clivage direct de l'ARNm par l'activité nucléase de la protéine AGO2 incorporée dans le complexe miRISC, même si ce mécanisme reste très rare. D'autre part, il semble que la dégradation médiée par les miARN pourrait être également une conséquence de la désadénylation suivie d'un décoiffage (l'élimination de la coiffe 5'). Différentes expériences montrent que GW182 entraîne une désadénylation de l'ARNm cible. L'extrémité N-terminale de GW182 interagit avec AGO grâce aux répétitions GW, alors que l'extrémité C-terminale interagit avec la protéine PABP (*poly-A binding protein*) recrutant le complexe désadénylase CAF1:CCR4:NOT1 (PAN2:PAN3 chez les mammifères), puis le décoiffage par le complexe DCP1:DCP2 et enfin la digestion exonucléolytique 5'-3' vraisemblablement par XRN1. Dans les cellules de *Drosophila melanogaster*, la désadénylation est effectuée par le complexe désadénylase CCR4:NOT (549). D'une manière intéressante, bien que la désadénylation semble être une condition préalable pour le décoiffage et la dégradation de l'ARNm, elle ne conduit pas nécessairement à ces résultats. Ainsi, dans une étude chez *D. melanogaster*, trois ARNm rapporteurs ont été analysés (549). Bien que tous les trois aient été complètement désadénylés, un seul est resté stable, un second n'a été que partiellement déstabilisé, alors que la dégradation du troisième a sensiblement augmenté. Ainsi le niveau de régulation de ces ARNm rapporteurs n'a pas été corrélé avec leur stabilité dans tous les cas : l'ARN désadénylé stable était encore fortement inhibé au niveau de la traduction (549).

IV.3.2.3. Séquestration des ARNm dans les corps P

Bien que beaucoup de protéines aient été identifiées dans les corps P (Voir. Chapitre IV.2.5 Complexe miRISC), la composition de ces « puits » cytoplasmiques n'a pas été déterminée, car ils n'ont jamais pu être purifiés jusqu'à présent (615). Néanmoins, plusieurs équipes ont montré que les protéines Argonaute - qui se lient aux miARN – ont été trouvées dans les corps P (Figure 28) (603,610,616–618). De plus, des études de co-immunoprécipitation indiquent que les protéines Argonaute DCPIA et GW182 interagissent d'une manière indépendante de l'ARN avec les composants des corps P (549,568,618). D'autres protéines impliquées dans les mécanismes d'action des miARN ont été également retrouvées en fortes concentrations dans les corps P, et trois études ont démontré que les ARNm cibles se localisent dans les corps P d'une manière dépendante des miARN (587,603,618).

Un modèle simple du mécanisme dépendant des corps P, par lequel les miARN régulent l'expression de leurs cibles, a été ainsi proposé (549,615,619). Dans sa forme la plus simple, un miARN lié à une protéine Argonaute reconnaît ses ARNm cibles par appariement de base. La protéine Argonaute interagit à son tour avec GW182, et le complexe ARNm-miARN-Argonaute est livré aux corps P. Quand ce complexe atteint le corps P, l'ARNm ciblé est désadénylé par les désadénylases résidentes, puis décoiffé et dégradé ou maintenu en stase (c'est-à-dire retiré spatialement de la machinerie traductionnelle, car les corps P sont dépourvus de ribosomes) (615,619). La stase a été démontrée par des expériences chez la levure montrant que les corps P peuvent constituer un lieu de dépôt pour les ARNm non traduits ; dans les cellules de mammifères, les corps P sont les lieux où un ARNm spécifique semble être séquestré en dehors des ribosomes de manière dépendante des miARN (587,620). Ce modèle a l'avantage de rationaliser une grande partie de la littérature actuelle en ce qui concerne les mécanismes d'action des miARN, y compris les destins disparates des ARNm spécifiques régulés. Bien que l'hypothèse des corps P soit séduisante et soutenue par plusieurs faisceaux de preuve, plusieurs observations semblent être incompatibles avec l'idée que les processus dépendants des corps P prennent en compte toutes les régulations médiées par les miARN. Spécifiquement, une analyse microscopique quantitative de la localisation de la protéine Argonaute a montré que seule une petite proportion (<2 %) de protéines Argonaute existe dans les corps P (621). En outre, plusieurs groupes ont montré que les miARN sont associés à des polysomes, et une étude récente a démontré que la plupart des miARN sont associés avec des ARNm en cours de traduction (486,607,608,622–624). De plus, la délétion d'un composant des corps P a provoqué la disparition de foyers visibles mais sans altérer la fonction des miARN (616).

Pour conclure, Il n'est pas encore clairement établi si les différents mécanismes d'inhibition proposés sont le fruit d'artefacts liés à différentes approches expérimentales, s'ils correspondent à des événements secondaires à un mécanisme initial commun, ou encore si les miARN sont capables de réprimer leurs cibles par différents mécanismes indépendants. Il est en effet possible que le mécanisme de répression utilisé dans chaque cas dépende du contexte cellulaire, de la cible, du type d'interaction miARN-cible, ou encore de la présence d'autres protéines de liaison à l'ARNm.

IV.4. Les microARN extracellulaires

La plupart des premiers miARN ont été décrits dans le milieu intracellulaire. Depuis 2008, des formes stables de miARN ont également été retrouvées dans le plasma et le sérum, ainsi que dans les fluides corporels dont l'urine, la salive et le lait maternel (584,625–628). De manière intéressante, la nature et la concentration de ces miARN extracellulaires retrouvés dans certains fluides corporels ont été

fortement corrélées à différentes pathologies comme le cancer. Le miR-222 par exemple est surexprimé dans le plasma des patients atteints de cancer colorectal et le miR-150 dans le sérum des patients atteints d'une leucémie lymphoïde chronique, de diabète et de lésions tissulaires (629–631). La quantification et la caractérisation de ces miARN extracellulaires pourraient ainsi permettre leur utilisation comme biomarqueurs.

Cependant, l'origine des miARN extracellulaires dans le plasma et dans les fluides corporels est mal connue. En effet, les miARN circulants pourraient être libérés par une lyse des cellules endommagées mais pourraient également être sécrétés activement par les cellules. Des études montrent que les cellules sanguines sont effectivement la source majeure des miARN circulants dans le sang (632). D'autres études indiquent que certains organes pourraient également contribuer à la présence des miARN extracellulaires, puisque des miARN connus pour être présents de manière importante dans des tissus spécifiques (miR-122 dans le foie, miR-133 dans les muscles, miR-208 dans le cœur, etc...) ont été détectés dans le plasma (633). D'autre part, il a été montré que les cellules tumorales mettent en jeu des mécanismes permettant une libération spécifique des miARN dans la circulation sanguine (631).

Les miARN extracellulaires circulent dans le plasma à une concentration élevée et avec une très bonne stabilité malgré la présence de RNases dans la circulation sanguine, indiquant une organisation stable des miARN empêchant leur dégradation. Plusieurs modèles de stabilité et de biogénèse des miARN extracellulaires ont été proposés (Figure 29).

Les miARN sont sécrétés des cellules via de petites vésicules membranaires (VMs) les protégeant de l'activité des RNases (634). Parmi les différentes vésicules, on retrouve les exosomes, des vésicules de 30 à 100 nm de diamètre qui proviennent des corps multivésiculaires et sont libérés par les cellules par exocytose (635).

D'autres types de vésicules libérées par bourgeonnement, nommées « *shedding vesicles* » et dont le diamètre est compris entre 100 et 1000 nm, sont également impliqués (636). Les VMs ont la capacité de délivrer les miARN qu'elles portent à des cellules réceptrices dans lesquelles ces miARN vont pouvoir exercer leur action sur leurs ARNm cibles. La sélection des miARN à transporter dans les VMs semble être spécifique de certaines conditions physiologiques ou physiopathologiques (637). Les miARN empaquetés dans les VMs sont, en général, associés et protégés par des protéines AGO2 ou d'autres protéines de liaison à l'ARN. Ceci suggère que les VMs ne portent pas seulement les miARN mais qu'elles permettent également de délivrer des composants fonctionnels du complexe RISC et donc de renforcer la fonction des miARN une fois introduits dans les cellules réceptrices, par endocytose, phagocytose ou par fusion directe avec la membrane cytoplasmique (638).

Les miARN peuvent être sécrétés en association avec des HDL (high-density lipoprotein) et protégés par la formation des complexes lipoprotéines-miARN (639). Ces HDL contiennent des lipides dont la phosphatidylcholine, connue pour former des complexes ternaires stables avec les acides nucléiques, et l'apolipoprotéine A-I (640). Ces particules possèdent une taille de 8 à 12 nm, donc beaucoup plus petites que les VMs, et interagissent avec les miARN extracellulaires par des ponts cationiques divalents (639). L'avantage principal de ces particules, outre la protection, est la possibilité de la livraison des miARN directement dans le cytoplasme, sans risque de prise en charge par des voies lysosomiales. Ceci est rendu possible grâce aux récepteurs SR-BI (*Scavenger receptor class B type I*) qui sont des récepteurs des HDL présents à la surface des cellules.

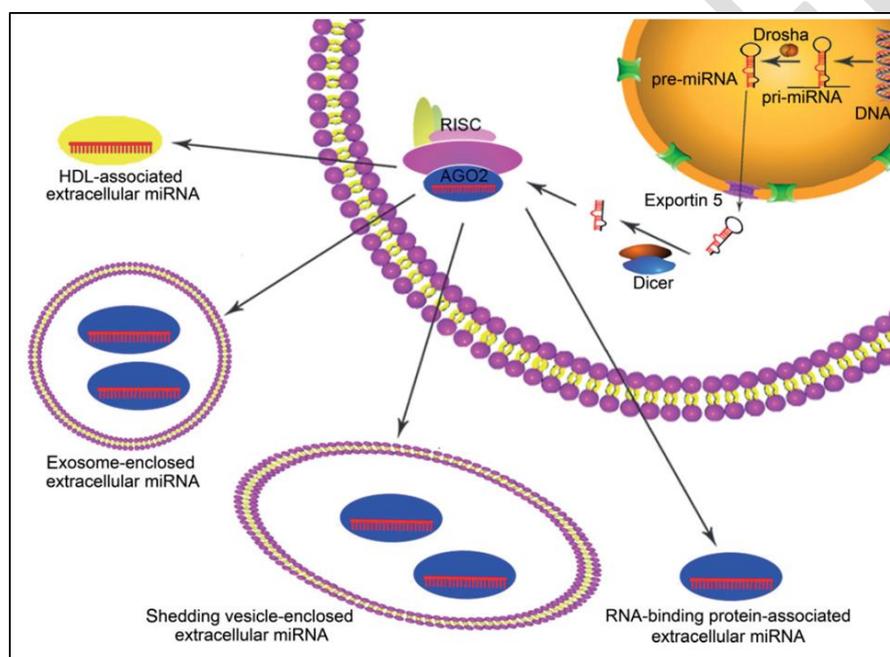


Figure 29. Modèle de circulation des miARN extracellulaires. Sous leur forme mature, certains miARN pourraient se lier à leur ARNm cible pour inhiber leur expression. D'autres miARN pourraient être exportés dans le milieu extracellulaire sous trois formes différentes : (1) inclus dans des petites vésicules membranaires dont les exosomes et les « shedding vésicules », (2) associés à des lipoprotéines de haute densité (HDL), et (3) associés à des protéines de liaison à l'ARN telles que Argonaute2 (AGO2) (628).

Des études récentes ont montré que 90 % des miARN circulant dans le sang sont associés à des protéines de liaison à l'ARN, les 10 % restant correspondant aux miARN portés par des VMs ou des HDL (641,642). Ainsi, une proportion significative a été retrouvée associée à la protéine AGO2, composante du complexe RISC. Ces complexes protéiques confèrent aux miARN une résistance à la grande quantité de RNases présentes dans la circulation. Onze protéines de liaison à l'ARN, dont la NPM (*nucleophosmin 1*) et la nucléoline, ont été identifiées comme associées à des miARN extracellulaires et permettant la protection des miARN contre les RNases (643).

IV.5. Fonctions biologiques et physiopathologiques des microARN

Dans ce chapitre, seuls quelques exemples du rôle des miARN dans la physiologie et les processus pathologiques seront présentés afin de mettre en avant l'importance de miARN dans les processus biologiques. Depuis leur découverte, les miARN ont été impliqués dans la régulation de quasiment tous les processus biologiques. Ils jouent un rôle particulièrement clé dans le développement et le maintien des états cellulaires souches et différenciées, mais également dans des processus cellulaires comme l'apoptose, la prolifération et la régulation du cycle cellulaire, le métabolisme etc... Ils constituent un outil clé et puissant dans la régulation des gènes et constituent donc une nouvelle classe potentielle de cibles thérapeutiques. Les miARN présentent une complémentarité largement limitée avec leurs ARNm cibles chez les animaux, mais cela reste suffisant pour réguler plusieurs processus physiologiques.

Il a été montré que certains miARN sont hautement spécifiques d'un tissu, d'un type cellulaire ou d'un stade de différenciation, constituant ainsi des profils d'expression spécifiques (644–650). Le séquençage et le clonage de 250 bibliothèques de petits ARNs provenant de 26 organes ou types cellulaires différents de rat et humains montrent que seulement 70 miARN matures s'expriment en moyenne par type d'échantillon (650). De même, l'étude du profil d'expression des miARN dans les lymphocytes T montre que seuls 7 miARN représentent 60 % des miARN exprimés (651). Le clonage des miARN dans l'épiderme et le follicule pileux de souris montre respectivement que 10 et 3 espèces représentent environ 50 % des miARN clonés (652). Notons également que le nombre de miARN exprimés est plus important dans les cellules différenciées par rapport aux cellules souches, ce qui est cohérent avec le rôle important que jouent les miARN dans l'induction de la différenciation puis le maintien des états différenciés (648). De même, la transfection d'un miARN spécifique d'un tissu, comme le miR-1 (spécifique du muscle et du cœur) ou le miR-124 (spécifique du cerveau) dans des cellules HeLa, modifie le profil d'expression des ARNm vers celui du tissu en question, avec une centaine de transcrits réprimés enrichis en cibles prédites du miARN transfecté (611). Certains miARN spécifiques d'un tissu sont donc capables de modifier l'expression de nombreux gènes, jouant ainsi un rôle dans la définition de l'identité tissulaire. Les miARN étant capables de cibler plusieurs dizaines de cibles, et les ARNm pouvant eux-mêmes être ciblés par plusieurs miARN, ces exemples montrent que les interactions entre miARN et cibles peuvent être vues comme un réseau où quelques miARN spécifiques assurent le maintien des états spatio-temporels cellulaires tels que l'identité tissulaire ou les états souches et différenciés.

L'expression d'un miARN à un moment précis peut permettre d'amorcer une transition au cours du développement ou de la différenciation en réprimant une ou des cible(s) à un niveau d'expression

virtuellement nul, où elles ne sont plus fonctionnelles. Par exemple, les mutations de perte de fonction des deux premiers miARN identifiés chez *C. elegans*, *lin-4* (*abnormal cell lineage-4*) et *let-7* (*lethal-7*) ont causé des défauts dans les processus de développement des larves (494,497). Il a ainsi été suggéré que *lin-4* régule les premiers stades de développement, alors que *let-7* joue un rôle important dans les processus de développement tardif chez *C. elegans* et peut-être chez d'autres animaux (653,654). Par ailleurs, le miARN *Isy-6* (*laterally symmetric-6*) détermine l'identité finale de deux neurones morphologiquement distincts, *ASE left* (ASEL) et *ASE right* (ASER). *Isy-6* est exprimée dans les neurones ASEL et inhibe l'expression de son gène cible, *cog-1* (*connection of gonad defective-1*), ce qui entraîne la perte d'asymétrie. De même, le miR-27a, joue un rôle important dans la différenciation érythroïde des cellules K562 humaines tout en ciblant la protéine CDC25B nécessaire à la transition des phases G2-M de croissance cellulaire (655). Les miARN peuvent également agir comme des sortes de rhéostats permettant d'ajuster finement le niveau d'expression de la cible à un niveau optimal pour sa fonctionnalité. Par exemple, le mir-375 est exprimé dans les îlots pancréatiques et inhibe la sécrétion d'insuline induite par le glucose grâce à la régulation de son gène cible, la myotrophine, nécessaire à l'exocytose de l'insuline, à un niveau permettant toutefois que la sécrétion de l'insuline soit fonctionnelle (656).

Certains miARN régulent divers processus physiologiques. Par exemple, les miARN jouent un rôle important dans **le maintien de la survie des neurones** matures et de leurs fonctions. Des études suggèrent que la croissance synaptique, dont l'excès conduit à l'apparition de maladies du système nerveux (maladie d'Alzheimer, autisme ...), peut être régulée par le miR-134 qui contribue au développement, à la maturation et à la plasticité synaptique (646). De même, le miR-133b est exprimé spécifiquement dans les neurones dopaminergiques (DNs) des noyaux de la base du cerveau et est diminué dans les neurones des patients atteints de la maladie de Parkinson. Le miR-133b régule la maturation et les fonctions des DNs du cerveau dans un réseau de rétrocontrôle négatif, ainsi que la régulation des comportements dopaminergiques tels que la locomotion (657). D'autres miARN interviennent également dans la régulation du système nerveux, comme par exemple le miR-8 impliqué dans la régulation du comportement en ciblant directement l'atrophine ou le miR-27a considéré comme un facteur inhibiteur endogène de l'expression du gène *Apaf-1* (*Apoptotic protease activating factor-1*) régulant ainsi la sensibilité des neurones à l'apoptose (658,659). Les microARN sont également impliqués dans **la régulation de l'angiogenèse** notamment durant le développement embryonnaire, dans laquelle le miR-126, spécifique des cellules endothéliales, semble jouer un rôle important *in vivo* (660). Ainsi, la délétion de ce miARN chez les embryons des souris provoque des hémorragies et une létalité embryonnaire partielle, dues à une perte de l'intégrité vasculaire et à des défauts dans la prolifération des cellules endothéliales, la migration et l'angiogenèse. Les souris

délétées du miR-126 qui survivent développent une néovascularisation cardiaque défectueuse après un infarctus du myocarde (661). Les miARN régulent également des processus physiologiques tels que **la maturation des ovocytes**, le développement du corps jaune (corpus luteum) et **le développement embryonnaire précoce**. Yu et al. ont rapporté 29 miARN exprimés différemment dans les testicules de souris prépubères et adultes, et ont identifié plusieurs ARNm cibles possibles dans les cellules germinales mâles (662). D'ailleurs, des ovocytes murins matures mutants dépourvus de tous les miARN (par la suppression spécifique de la protéine Dicer des ovocytes), n'ont pas pu dépasser le stade de la première division cellulaire probablement en raison de la formation désordonnée du fuseau achromatique, démontrant que les miARN maternels sont essentiels pour les premiers stades du développement embryonnaire (663). De même, une étude a montré une expression différentielle de 59 miARN, dont 31 et 28 miARN étaient exprimés de préférence respectivement dans les ovocytes immatures et matures (664). Ce profil d'expression de miARN au cours des stades embryonnaires pré-implantatoires a montré donc un modèle d'expression temporelle distinct (664).

La dérégulation des miARN a été décrite dans plusieurs maladies dont **les maladies cardiaques** et le cancer. Par exemple, le miR-21 régule la voie de signalisation d'ERK-MAPK dans les fibroblastes cardiaques, laquelle a un impact sur la fonction et la structure cardiaque globale (644). Les niveaux du miR-21 sont augmentés sélectivement dans les fibroblastes des cœurs défailants, augmentant l'activation de la voie ERK-MAPK par l'inhibition de la protéine SPRY1 (*sprouty homologue 1*). L'inhibition *in vivo* du miR-21 par un antagonir (anti-miARN) spécifique dans un modèle murin d'hypertension réduit l'activation de la voie ERK-MAPK cardiaque, inhibe la fibrose interstitielle et atténue le dysfonctionnement cardiaque. Une étude récente a montré que la protéine PDCD4 (*programmed cell Death 4*) représente une cible directe du miR-21 dans les myocytes cardiaques (665). Ces résultats montrent que les miARN peuvent contribuer à la maladie myocardique par leurs effets sur les fibroblastes cardiaques (666).

Le développement cellulaire anormal dans le cas du **cancer** a également été associé aux miARN. La première étude liant les miARN à la pathologie cancéreuse a été publiée en 2002 et elle a analysé l'expression des miARN dans des échantillons de sang de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique. Deux miARN, le miR-15 et le miR-16, étaient absents ou faiblement exprimés dans la majorité des cas (68 %) par rapport aux tissus normaux ou aux lymphocytes. Cette découverte suggère que ces deux miARN sont impliqués dans la pathogenèse de la leucémie lymphocytaire chronique (667). Les miARN fonctionnent comme des molécules régulatrices, en ayant soit un rôle d'oncogènes, soit un rôle de suppresseurs de tumeurs (668). Par exemple, le miR-34a, qui s'est avéré être fréquemment absent dans les cellules cancéreuses du pancréas, est induit par la protéine

suppresseur de tumeur p53 (669). La surexpression de ce miARN induit l'expression des gènes impliqués dans la régulation de la progression du cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN et l'angiogenèse. L'expression du miR-34a est complètement inhibée dans plusieurs types de cancer, en raison d'une méthylation aberrante de la séquence CpG de son promoteur (670). La famille let-7 des miARN était le premier groupe des miARN décrit comme régulant l'expression d'un proto-oncogène, la protéine RAS (671). Johnson et al. ont confirmé expérimentalement que let-7 peut inhiber l'expression de RAS dans des lignées cellulaires cancéreuses humaines limitant ainsi la croissance cellulaire et la tumorigenèse (672). Dans des cellules issues du cancer du sein, le miR-9 est surexprimé et cible directement CDH1, ARNm codant l'E-cadhérine, entraînant une augmentation de la motilité et l'invasivité cellulaire ainsi que l'activation de la signalisation de la β -caténine qui contribue à la surexpression du gène codant la VEGF. Ce dernier facteur de croissance agit à son tour sur l'augmentation de l'angiogenèse tumorale (673). Par ailleurs, le miR-155 pourrait inhiber l'apoptose dans des cellules de leucémie humaines et dans les cellules cancéreuses MDA-MB-453, en bloquant l'activité de la caspase-3 (674). Dans le carcinome hépatocellulaire le miR-26 est sous-exprimé et pourrait activer les voies de signalisation de NF- κ B, induisant ainsi la production d'IL-6, ce qui pourrait jouer un rôle dans le développement de la tumeur (675). Certains miARN sont inhibés dans les cancers gastro-intestinaux, ce qui suggère qu'ils peuvent fonctionner comme des gènes suppresseurs de tumeurs. Par exemple, les miR-15b et miR-16 sont inhibés dans les cellules cancéreuses gastriques humaines et jouent un rôle dans le développement de la multirésistance aux médicaments (MDR) par modulation de l'apoptose via le ciblage de la protéine BCL2 (676). Récemment, Ueda et al. ont réalisé un profil systématique et une analyse utilisant 353 échantillons gastriques et ont identifié 22 miARN surexprimés et 13 miARN inhibés dans le cancer gastrique (CG) (677). Cette signature présentait une précision de 83 % pour la distinction des échantillons de CG des échantillons sans CG. En outre, les deux sous-types histologiques des tissus de CG présentaient différentes signatures : huit miARN étaient régulés dans le CG type diffus et quatre dans le CG de type intestinal (677).

IV.6. MiARN et infections bactériennes

Les bactéries pathogènes ont des interactions complexes avec leur hôte, ces interactions étant devenues un domaine de recherche central des maladies infectieuses. Des études récentes ont mis en évidence que l'expression des miARN chez l'hôte est profondément affectée par une variété de bactéries pathogènes et en retour les miARN de l'hôte imposent une forte pression aux microorganismes (Figure 30).

Par exemple, *Helicobacter pylori* est capable de coloniser l'estomac humain et est donc responsable de diverses maladies gastriques, telles que la gastrite chronique active, les ulcères peptiques et le carcinome gastrique (678,679). Plusieurs études ont rapporté que l'infection des cellules épithéliales gastrique par *H. pylori* pourrait conduire à une expression altérée des miARN let-7, miR-30b, miR-210, miR-1289, miR-152/miR-200b, miR-155, miR-16 et miR-146a (680–688). L'analyse histologique de la muqueuse gastrique infectée a montré des taux plus élevés du miR-155. Des sites de liaison potentiels au facteur NF- κ B ainsi qu'à la protéine AP-1 ont été identifiés dans le promoteur BIC du miR-155, suggérant que ces deux protéines sont impliquées dans l'induction de l'expression du miR-155 durant l'infection par *H. pylori* dans l'épithélium gastrique (686). De nombreux ARNm ciblés par le miR-155, y compris ceux des protéines TP53INP1 (*tumor protein p53-inducible nuclear protein 1*), tétraspanine 14 (Tspan14), lipine 1 (Lpin1), Pmaip1 (*horbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*), PKI α (*protein kinase cAMP-dependent, catalytic inhibitor alpha*), IKK- ϵ (I κ B kinase ϵ), SMAD2 (*Sma- and Mad-related protein 2*), et FADD (*Fas-associated death domain protein*), ont été associés à des réponses pro-apoptotiques et immunitaires (686,689–691). Des souris knock-out pour le miR-155 n'ont pas été en mesure de contrôler l'infection à *H. pylori* et présentaient une protection réduite vis-à-vis de l'infection, suite à leur vaccination spécifique contre *H. pylori*, par rapport aux souris sauvages, en raison d'une altération des réponses Th1 et Th17 (692). Ces résultats suggèrent que le miR-155, lors d'une infection à *H. pylori*, est impliqué dans la régulation négative de l'inflammation par atténuation de la voie de signalisation de NF- κ B, la différenciation de Th17/Th1 et la régulation de l'AMPc (*cyclic adenosine monophosphate*) (686,691). Un autre miARN, le miR-146a, est surexprimé après une infection par *H. pylori* dans les cellules épithéliales gastriques, ainsi que dans les tissus muqueux gastriques, de manière dépendante de NF- κ B. Par conséquent, le miR-146a peut diminuer l'expression des gènes cibles, par exemple, TRAF6 et IRAK1. De plus, le miR-146a peut inhiber l'expression des protéines GRO α (*growth-related oncogen alpha*), MIP-3a (*macrophage inflammatory protein-3a*), TNF- α et IL-1 β , en réduisant l'activité de NF- κ B (693,694).

De nombreuses relations ont été également établies entre l'infection par *Salmonella* et les miARN. Les salmonelles sont des pathogènes intracellulaires à Gram négatif appartenant à la famille des Enterobacteriaceae, responsable de pathologies chez les humains et les animaux, tels que la gastro-entérite et la fièvre typhoïde (695). *S. enterica* possède trois sérovars principaux, *Typhi*, *Typhimurium*, et *Enteritidis*, capables d'établir une niche intracellulaire pour assurer leur propagation chez l'hôte (696). L'infection par *S. Typhimurium* induit une surexpression du miR-29a, qui cible la cavéoline 2, un facteur d'adhésion focal associé à l'internalisation de bactéries pathogènes (697,698). De même, le miR-146 diminue l'induction de six membres de la famille des gènes de l'apolipoprotéine dans des embryons de poisson zèbre infectés par *S. Typhimurium*. Cela suggère que

le miR-146 pourrait jouer un rôle dans la régulation du métabolisme lipidique pendant l'inflammation (699). De plus, le récepteur TLR4 reconnaît le LPS bactérien et inhibe ainsi l'expression de la famille let-7 durant l'infection à *Salmonella*. L'inhibition de ces miARN favorise l'expression des cytokines clés IL-6 et IL-10 (698). D'ailleurs, le miR-155 régule la fonction des lymphocytes et des DC, conduisant à une diminution globale de la réponse immunitaire ; ainsi, la vaccination de souris déficientes en miR-155 avec un vaccin atténué contre *S. Typhimurium* n'a pas permis de les protéger (700). *S. Enteritidis* module les niveaux du miR-128 dans l'épithélium intestinal, ce qui inhibe la sécrétion de M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating factor* ou CSF1) et par la même le recrutement des macrophages (701).

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste à Gram négatif qui infecte un large éventail d'hôtes, envahissant de nombreux tissus (702). Les infections à *Pseudomonas* multirésistants peuvent être mortelles pour les patients hospitalisés dans les unités de soins intensifs dans le monde entier (703). Il a été récemment rapporté que le miR-302b peut être activé par les TLR2 et TLR4 via les voies ERK-p38-NF- κ B après une infection par *P. aeruginosa*. Le miR-302b, avec d'autres membres de la famille des miR-302, est un régulateur crucial en aval de la voie de signalisation NF- κ B induite par les récepteurs TLRs, mais également de l'activation des macrophages et des cellules épithéliales, et de l'inflammation respiratoire via le ciblage direct d'IRAK1, essentiel pour l'activation de NF- κ B (704). Il a été également montré que le miR-301b module positivement l'expression des cytokines anti-inflammatoires IL-4 et TGF- β 1 et régule négativement l'expression des cytokines pro-inflammatoires MIP-1a et IL-17A. Cette fonction est exercée par l'inhibition de l'expression de c-Myb. De plus, l'inhibition du miR-301b entraîne des niveaux élevés d'infiltration de neutrophiles (705). Il existe plusieurs autres miARN de rétrocontrôle négatif, tels que les miR-762 et miR-155, surexprimés par l'infection à *P. aeruginosa* et réduisant les niveaux de l'expression des gènes de la réponse immunitaire (706,707).

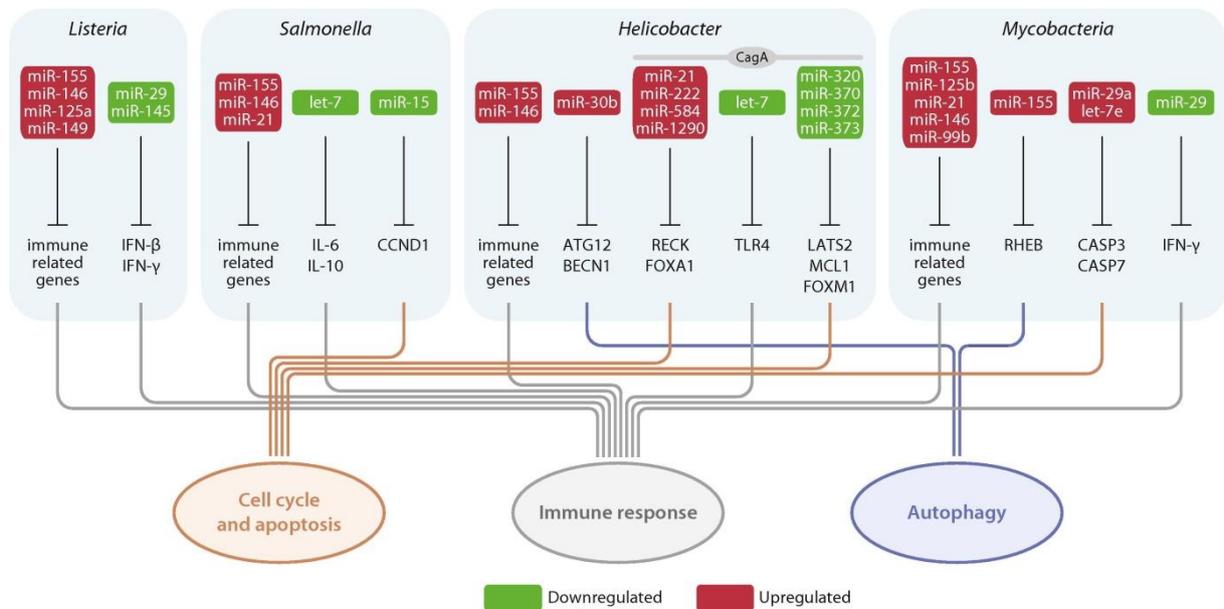


Figure 30. Exemples des microARN régulés par des infections bactériennes. Les infections bactériennes induisent des modifications dans l'expression des miARN intracellulaires qui pourraient avoir des effets de régulation positive ou négative sur plusieurs processus cellulaires dont l'autophagie, l'apoptose et la réponse immunitaire. Ces régulations pourraient contribuer soit à la défense de l'hôte soit, au contraire, à l'invasion de l'hôte par l'agent pathogène (708).

La tuberculose est une maladie infectieuse très répandue, responsable de fortes morbidité et mortalité, dépassant des dizaines de millions de personnes chaque année dans le monde. Les deux bactéries intracellulaires *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium bovis* peuvent infecter les animaux et les humains et représentent les mycobactéries (709). Concernant la réponse immunitaire innée, Dorhoi et al. ont démontré que le miR-223 contrôle la susceptibilité à la tuberculose par le recrutement de neutrophiles en ciblant les cytokines CCL3 (*chemokine (C-C motif) ligand 3*), CXCL2 (*chemoattractant chemokine (C-X-C motif) ligand 2*), et IL-6. La délétion du miR-223 augmente la susceptibilité à l'infection pulmonaire des souris résistantes à l'infection par *M. tuberculosis* (710). *M. tuberculosis* pourrait également induire l'expression du miR-99 dans les cellules dendritiques (DC) ; l'inhibition de ce miARN augmente considérablement le taux des cytokines pro-inflammatoires IL1β, IL-12 et IL-6, et diminue la charge bactérienne (711). Le miR-155 est également surexprimé dans les macrophages après une infection à *M. tuberculosis* et *M. bovis*. La surexpression du miR-155 favorise l'autophagie dans les macrophages, facilite la maturation du phagosome et la production de ROS diminuant ainsi le taux de survie des mycobactéries intracellulaires (712,713). Les souris déficientes en miR-155 infectées par *M. tuberculosis* meurent beaucoup plus tôt que les souris sauvages, et présentent une augmentation drastique de la colonisation bactérienne pulmonaire (714). Cependant, le miR-155 pourrait également faciliter la survie de *M. tuberculosis* dans les macrophages par l'atténuation directe de l'expression de Bach1 (BTB and CNC homology 1), un inhibiteur transcriptionnel de l'haemoxygénase-1 (HO-1), et de SHIP1 (*SH2-containing inositol 5'-phosphatase 1*

), importants pour la survie de *M. tuberculosis* (715). L'expression d'autres miARN est altérée suite à l'infection par les mycobactéries. Parmi ces miARN figurent les miR-132/212, miR-26a, miR-125a, miR-21 et miR-146a lesquels jouent des rôles de régulateurs positifs ou négatifs de la réponse de l'hôte [711]–[713], [714,], [715], [716].

Listeria monocytogenes peut échapper aux défenses de l'hôte régulant les miARN dans différentes cellules. Les miR-146b, miR-16, let-7a 1, miR-145 et miR-155 sont significativement régulés suite à une infection par *Listeria* dans les cellules épithéliales (722). Schnitger et al. ont démontré que *L. monocytogenes* induit des modifications significatives dans l'expression des miARN dans les macrophages, les miR-146a, miR-155, miR-125a-3p / 5p, et miR-149 étant les plus altérés. Il a été montré que les miR-125a-3p/5p sont impliqués dans l'axe de signalisation du récepteur TLR2, tandis que la transactivation du miR-155 lors de l'infection est influencée par NF-κB p65 (723).

Beaucoup d'autres rapports de la littérature ont décrit une régulation des miARN induite par d'autres infections bactériennes, comme c'est le cas des miR-15a et miR-16 dans le sepsis provoqué par *Escherichia coli*, et du miR-718 surexprimé dans des macrophages infectés par *Neisseria gonorrhoeae* (724,725). Les exemples décrits ci-dessus ne représentent qu'une très petite partie des études publiées dans la littérature montrant que la régulation des miARN par les infections bactériennes pourrait affecter plusieurs fonctions physiologiques cellulaires et plusieurs processus pathologiques dépendant de leurs gènes cibles. Les miARN pourraient réguler les mécanismes de l'autophagie et de l'apoptose ainsi que d'autres réponses de l'hôte comme la régulation de la signalisation des récepteurs TLRs qui sera discutée dans le chapitre suivant. Ces régulations pourraient être en faveur du développement bactérien et de l'invasion de l'hôte mais également en faveur des défenses de l'hôte et d'une réponse efficace et contrôlée (708).

IV.7. MiARN et infections virales

Les virus représentent une large classe de parasites intracellulaires obligatoires qui dépendent de la machinerie de l'hôte pour se multiplier et se propager. En conséquence, les virus et leurs hôtes se sont engagés dans une course pour pouvoir assurer leur survie respective. Le rôle joué par les miARN dans les infections virales a fait l'objet de nombreuses études au cours des 15 dernières années.

La première interaction miARN-virus découverte est celle impliquant le miR-122 et le virus de l'hépatite C (VHC). Le VHC est un virus hépatotrope avec un génome ARN simple brin positif. Le miR-122 spécifique au foie est essentiel à la réplication virale et régule positivement le virus par l'interaction directe du miARN et du génome viral qui contient trois sites de liaison différents pour le miR-122 dans les régions 3' et 5' UTR. La fonction régulatrice du miR-122 est exercée après la liaison

à la région 5' UTR du génome, en amont du site d'entrée ribosomique interne (IRES) et conduit l'accumulation de l'ARN viral et à une augmentation de la traduction de la protéine virale, après recrutement de la sous-unité ribosomale 48S (584,726). Toutefois, il semblerait que le mécanisme dominant à l'origine de l'effet positif de la liaison du miR-122 est la protection de l'extrémité 5' de l'ARN génomique. En effet, la liaison de l'AGO2 chargée du miR-122 stabilise l'ARN du VHC tout en empêchant sa dégradation très probablement causée par l'exonucléase XRN1 (727–729).

Le nombre d'exemples d'inhibition viral par une liaison directe des miARN ciblant le génome viral reste limité (730). Ceci pourrait être expliqué par une pression de sélection qui entrainerait l'élimination des séquences cibles de miARN dans le génome viral, ces séquences étant délétères pour le virus. Cette théorie est étayée par l'observation selon laquelle la majorité des interactions directes entre les miARN de l'hôte et l'ARN viral aboutit plutôt à une régulation positive du cycle viral. Dans ce cas en effet, si la liaison du miARN au sein du génome procure un avantage évolutif et / ou augmente la capacité virale, elle sera alors maintenue par le virus (730).

Les effets indirectes des miARN sur la multiplication virale ont largement été décrits dans la littérature. L'effet indirect sur les virus est dû au ciblage d'ARNm codant des facteurs de l'hôte impliqués dans une ou plusieurs étapes du cycle viral, ou des facteurs impliqués dans l'établissement de la réponse immunitaire. Un exemple est représenté par le rôle des miARN dans le tropisme cellulaire et l'entrée du virus par la régulation de l'expression de son récepteur cellulaire spécifique. Il a été montré que l'expression du récepteur du virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1), la protéine de surface CD4, est régulée par deux miARN : les miR-221 et miR-222. Ces deux miARN sont en effet sous exprimés dans les macrophages infectés (731). En outre, le tropisme du VIH-1 est également déterminé par deux co-récepteurs différents, CCR5 ou CXCR4. Une cascade de signalisation impliquant le miR-146a régule l'expression de CXCR4 dans les lymphocytes T CD4⁺ quiescents, les rendant ainsi moins susceptibles à l'infection par le VIH-1. Cependant, après l'activation de ces cellules T, le facteur de transcription PLZF régule négativement l'expression du miR-146a, conduisant à l'expression du CXCR4, rendant ainsi les cellules susceptibles à l'infection (732). Les miARN pourraient également affecter d'autres niveaux du cycle viral comme dans le cas du poliovirus, où le miR-555 permet une inhibition de la réplication virale en ciblant la protéine hnRNP C, nécessaire au mécanisme de réplication (733). Des processus cellulaires comme la réponse immunitaire innée ou l'apoptose, pourraient être également régulés en faveur de l'infection virale.

Enfin, il est important de noter que certains virus codent leurs propres miARN, ce qui ajoute un mécanisme supplémentaire de régulation cellulaire médiée par le virus. Ces petits ARN viraux

joueraient un rôle important durant l'infection en mimant des miARN de l'hôte et en agissant directement sur les fonctions cellulaires (734).

IV.8. MiARN et réponse immunitaire

Au cours de la dernière décennie, des études ont démontré que les miARN agissent comme des « régulateurs fins » du système immunitaire, jouant un rôle central dans le développement et l'homéostasie des cellules immunitaires (Figure 31).

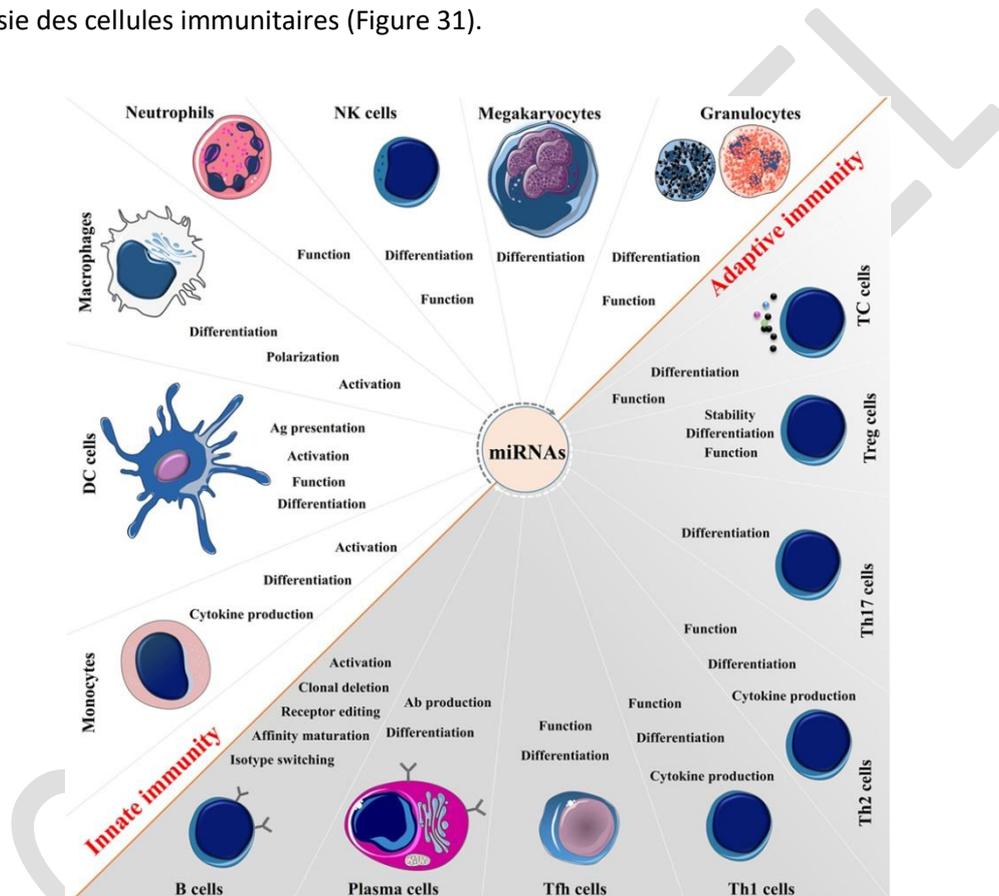


Figure 31. Régulation des fonctions des cellules immunitaires par les microARN. Les miARN sont exprimés dans les cellules immunitaires et fonctionnent comme des « régulateurs fins » pour les réponses immunitaires innées et adaptatives. Ils représentent une partie importante des réseaux de régulation dans l'immunité innée et régulent les fonctions des cellules immunitaires telles que les monocytes, les cellules dendritiques (DC), les macrophages, les neutrophiles, les cellules NK, les mégacaryocytes et les granulocytes. Dans l'immunité adaptative, ils sont impliqués dans tous les processus biologiques, y compris les voies impliquées dans le développement des cellules T et B, la différenciation, la tolérance centrale et périphérique, ainsi que leur fonction (735).

D'une manière importante, certains miARN tels que le miR-146 et le miR-155 ont un impact sur l'activation des voies de défense de l'hôte, lesquelles sont liées au contrôle de l'immunité et aux séquelles inflammatoires (736). Des études antérieures ont démontré qu'un seul miARN peut jouer

un rôle central dans le développement de l'immunité innée et adaptative et que, dans certaines conditions, il peut agir comme une voie de rétrocontrôle négatif, modulant et affectant le dysfonctionnement immunitaire et la maladie (737). Les études mécanistiques ont suggéré que cette fonction critique dépend des interactions entre, d'une part les miARN et d'autres part les facteurs de transcription et les protéines de signalisation ciblés, ainsi qu'entre les miARN et des régulateurs de la mort cellulaire ciblés (738). Alternativement, le système immunitaire peut réguler la biogenèse des miARN à plusieurs niveaux, allant de la transcription et la maturation des miARN jusqu'à leur incorporation dans le complexe RISC et leur localisation dans leur site d'action (739). Outre le rôle essentiel des miARN dans la régulation du système immunitaire, ces molécules sont également capables d'agir comme des agents intracellulaires directs pour lutter contre les agents pathogènes (740).

Les miARN représentent une partie importante des réseaux de régulation de la réponse immunitaire innée, agissant comme première ligne de défense. L'activation des voies de défense innées telles que la signalisation des récepteurs TLR entraîne des modifications de l'expression des miARN pouvant réguler l'expression génique pro-inflammatoire (741). Les miARN régulés peuvent moduler la traduction des transcrits, entraînant une diminution des taux de facteurs immunomodulateurs qui inhibent ou déclenchent la réponse inflammatoire, agissant ainsi comme des freins « *on/off* » pour réguler l'inflammation (742). Les miARN participent à la modulation des fonctions des cellules épithéliales, à la maturation des macrophages et des cellules dendritiques, à la prolifération des granulocytes et des monocytes et à la fonction des cellules tueuses naturelles NK (*Natural killer*) (743–747).

Les miARN sont des régulateurs clés du développement et de la génération de différentes lignées de lymphocytes T auxiliaires, ainsi que de la fonction des cellules T CD4 + (748). Ils jouent également un rôle central dans le développement, la prolifération, la survie, la migration, la différenciation et les fonctions effectrices des cellules T CD8 + et des cellules T régulatrices (Treg) (749,750). Dans les cellules B, les miARN semblent jouer un rôle clé dans la différenciation précoce et effectrice, y compris la commutation d'isotypes et la maturation par affinité, ainsi que dans la réponse des cellules matures et de mémoire (751,752). De façon intéressante, et liée au développement de maladies auto-immunes, les miARN sont impliqués dans l'édition des récepteurs et dans la délétion clonale nécessaires au maintien de la tolérance des lymphocytes T et B contre les auto-antigènes. Ainsi, une expression aberrante de ces miARN est corrélée à l'apparition et au pronostic de nombreuses maladies auto-immunes (753). À titre d'exemple, les cellules B déficientes en Dicer produisent des titres élevés d'anticorps autoréactifs, ce qui correspond au phénotype d'auto-immunité chez les modèles animaux (754). Les miARN sont également impliqués dans la production

de cytokines par les lymphocytes et dans la présentation de l'antigène par les cellules dendritiques (755). De plus, les miARN ont la capacité de réguler les conditions épigénétiques dans les lymphocytes telles que la méthylation, amplifiant la force et la sensibilité de la signalisation des récepteurs des cellules T et B (735,756). Ces données indiquent que le système des miARN représente un réseau de régulation critique dans plusieurs processus biologiques et implique à la fois les réponses immunitaires innées et adaptatives.

IV.8.1. MiARN et inflammation

L'inflammation est une réponse biologique physiopathologique complexe induite par une infection et/ou par des lésions tissulaires et implique un réseau de molécules effectrices et des régulations à effet pro- et anti-inflammatoires (757,758). La réponse inflammatoire possède un large éventail de stimuli et peut être considérée comme une « arme à double tranchant ». En son absence, l'homéostasie ne peut pas être rétablie. D'autre part, l'inflammation excessive peut induire des lésions tissulaires réversibles ou permanentes et engendrer des processus pathologiques (759,760). L'inflammation implique une séquence d'événements harmonisés, consécutifs et souvent auto-limitatifs contrôlés par des réseaux régulateurs positifs et négatifs (757). Ainsi, les réseaux moléculaires qui régulent l'initiation, la propagation et la résolution de l'inflammation doivent être adaptés pour optimiser la réponse immunitaire innée (Figure 32) (761).

Outre les facteurs de régulation des protéines, les miARN ont émergé comme régulateurs clés de l'inflammation, et ils modulent potentiellement la signalisation dès le déclenchement à la fin de l'inflammation. Selon les ARNm cibles, les miARN peuvent, soit favoriser, soit contrecarrer l'inflammation (761,762). Par conséquent, le système immunitaire utilise plusieurs miARN pour réguler correctement sa capacité fonctionnelle, établissant ainsi un équilibre fin entre l'activation et l'inhibition du processus inflammatoire (762). L'interaction entre les miARN et la réponse inflammatoire est intensément étudiée car cette interaction peut contribuer à une meilleure compréhension de la façon dont l'altération de l'homéostasie immunitaire peut être associée aux conditions d'auto-immunité et à plusieurs autres maladies inflammatoires chroniques dont la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, les colites ulcéraives, la pancréatite et l'arthrosclérose (763–769).

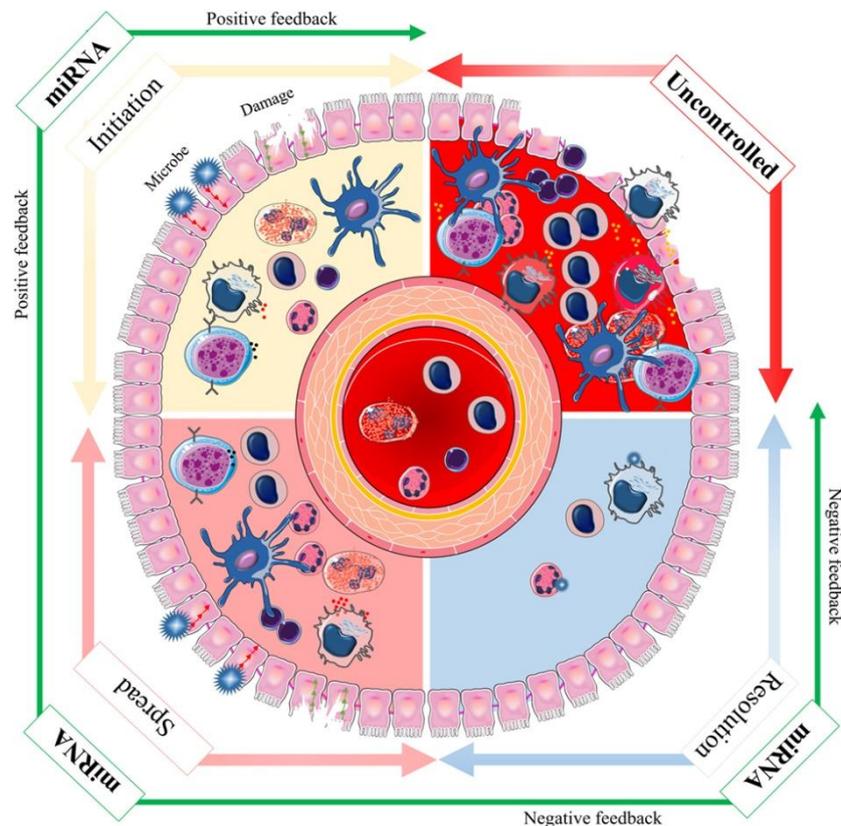


Figure 32. Le spectre des effets de microARN pendant l'inflammation. L'inflammation est une réponse biologique et physiopathologique tissulaire complexe face aux stimuli nocifs, tels que l'infection et les lésions tissulaires. Les étapes d'initiation, de propagation et de résolution de l'inflammation sont soumises à des événements régulateurs positifs et négatifs via les miARN afin d'aboutir à une réponse immunitaire optimale (flèches vertes). Le rétrocontrôle positif est activé pour déclencher une cascade d'événements moléculaires qui mènent à la lutte contre les agents pathogènes envahissants et à la réparation réussie des lésions tissulaires. Le rétrocontrôle négatif n'est activé que pendant une inflammation grave et peut être essentiel pour prévenir une inflammation potentiellement excessive et dangereuse. L'absence d'initiation ou de dissémination appropriée entrave la réponse immunitaire innée, et l'absence de résolution correcte peut entraîner une maladie grave et un état incontrôlé (flèches rouges). Ainsi, les réseaux moléculaires basés sur les miARN qui régulent l'initiation, la propagation et la résolution de l'inflammation doivent être adaptés de manière appropriée pour optimiser la réponse immunitaire innée (735).

La régulation de l'inflammation par les miARN est principalement due à une expression modifiée de miARN spécifiques dans les cellules stimulées (770). Il existe également des preuves que la biogenèse des miARN est régulée dans le cadre de la réponse inflammatoire, en modifiant la transcription, le traitement ou la stabilisation des transcrits de miARN matures ou précurseurs (761,771). Les étapes d'initiation, de propagation et de résolution de l'inflammation sont sujettes à des événements de régulations positifs et négatifs via les miARN (393). Le rétrocontrôle positif déclenche une cascade d'événements moléculaires qui permettent de lutter contre l'invasion d'agents pathogènes microbiens et de réparer avec succès les lésions tissulaires. En revanche, le rétrocontrôle négatif, activé uniquement lors d'une inflammation importante ou sévère, est essentiel pour prévenir les processus potentiellement préjudiciables en phase terminale et maintenir l'homéostasie tissulaire. Les miARN exercent leurs fonctions anti- ou pro- inflammatoires via de multiples voies, impactant dans la majorité des cas la régulation des voies de signalisation des récepteurs TLRs.

IV.8.2. MiARN et voies de signalisation des récepteurs TLRs

Plusieurs mécanismes impliqués dans la régulation des voies de signalisation des TLRs ont été décrits, dont les interactions physiques, les modifications conformationnelles, les phosphorylations, l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome des différents effecteurs. Des études récentes indiquent que les miARN s'ajoutent aux mécanismes de régulation des voies dépendantes des TLR jouant ainsi un rôle immunomodulateur de la réponse immunitaire innée (772).

L'expression des miARN peut être induite aux temps précoces de l'activation des TLRs, ce qui pourrait contribuer au développement d'une réponse pro-inflammatoire. La première description d'une telle induction a été publiée en 2006, avec la surexpression des miR-146a, miR-155 et miR-132 dans des monocytes humains stimulés par du LPS (773). À ce jour, presque toutes les expressions de miARN semblent dépendre des voies NF- κ B et MAPK induites par les récepteurs TLRs. L'expression de nombreux miARN, dont les miR-146a, miR-155, miR-132, miR-223, miR-147, miR-9, miR-27b, let-7e, miR-21, miR-16, miR-23b, miR-30b, miR-301a et miR-125b, est induite d'une manière dépendante de NF- κ B après une stimulation d'un récepteur TLR (743,745,773–785). Par exemple, l'expression du miR-9 est directement induite par le LPS via la voie TLR4-MyD88-NF- κ B-dépendante dans les monocytes et les neutrophiles humains (776). En outre, l'expression du miR-155 est induite de manière dépendante de NF- κ B dans divers types cellulaires après de nombreux stimuli, y compris le LPS et la LMP1, la protéine latente virale du virus Epstein-Barr (745,779). L'expression du miR-146a peut également être induite par la voie dépendante de NF- κ B en réponse à divers médiateurs immunitaires tels que le LPS, l'IL-1 β , la LMP1 et le TNF- α (744,773,778,780). Inversement, certains miARN (miR-29b, let-7i, miR-98, miR-107, miR-27a et miR-532-5p) sont inhibés par la voie dépendante de NF- κ B induite par les TLRs (780,786–791).

La voie MAPK est également impliquée dans la régulation de l'expression des miARN. Par exemple, les miR-21, miR-146b, miR-155 et miR-146b-5p seraient régulés positivement par les hétérodimères Fos et Jun dans différents types de cellules en réponse à divers stimuli (745,792–794). La voie MAPK est également impliquée dans la régulation négative de l'expression des miARN, comme c'est le cas du miR-99a (795). Cependant, d'autres voies cellulaires sont également responsables de la régulation de l'expression des miARN. Par exemple, l'expression du miR-132 est régulée par la protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMP cyclique et par le coactivateur transcriptionnel p300 (782). L'expression du cluster des miR-143/145 est inhibée par JAK1 (*Janus Kinase 1*) et dépendante de la voie STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) (796).

Comme expliqué précédemment (Voir III.1 Les Toll-like récepteurs), l'activation des voies de signalisation dépendantes des TLRs est nécessaire à l'élimination de différents microorganismes

pathogènes. Cependant, une activation excessive de ces voies pourrait interrompre l'homéostasie immunitaire, provoquant des lésions tissulaires et des maladies diverses, dont les maladies auto-immunes, les maladies inflammatoires chroniques ou les cancers. Par conséquent, la régulation de la signalisation des voies TLR est indispensable au contrôle de la réponse inflammatoire. Les miARN sont impliqués dans la régulation des signalisations des TLRs en agissant à des niveaux différents, y compris la régulation de l'expression des TLR eux-mêmes, des protéines et des molécules associées à la signalisation TLR, des facteurs de transcription et au niveau de l'expression des cytokines (Figure 33) (772,797).

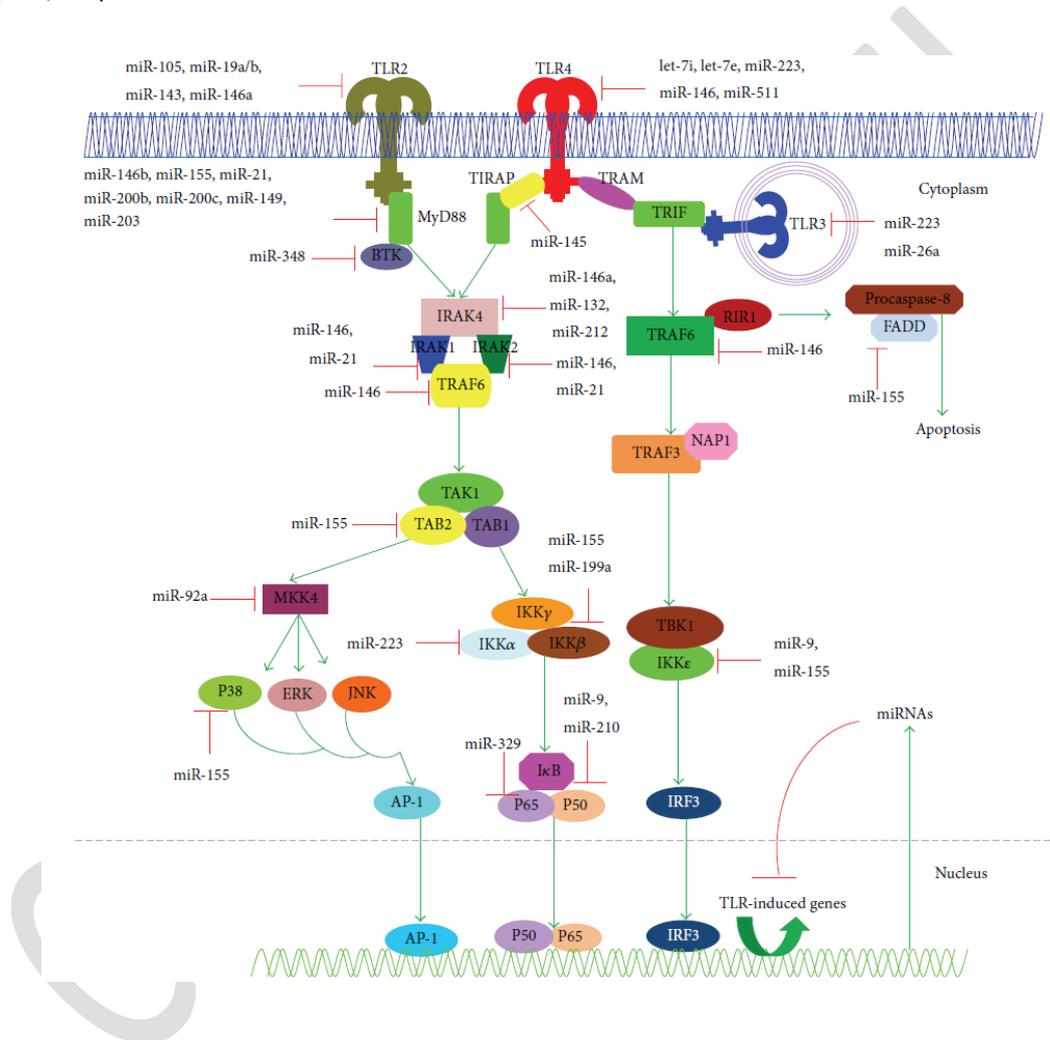


Figure 33. L'inhibition des voies de signalisation des TLRs par les miARN. Les miARN interviennent dans la régulation des voies de signalisation des TLRs et de la réponse immunitaire innée en ciblant l'ARNm de nombreuses molécules et en agissant à plusieurs niveaux y compris les TLRs eux-mêmes, les protéines effectrices, les molécules régulatrices et les facteurs de transcription induits par les TLRs (798).

Puisque les miARN sont des régulateurs d'expression de gènes, la régulation de l'expression des TLRs pourrait être une cible clé des miARN. Par exemple, il a été montré que des miARN de la famille de let-7, dont let-7e et let-7i, inhibent l'expression des TLR4 dans des macrophages de souris, après stimulation par du LPS (774). De même, le miR-223 régule négativement l'expression des TLR4 et

TLR3 dans les granulocytes (743), et le miR-146a régule négativement l'expression de TLR4 dans les macrophages et de TLR2 après stimulation par de la lipoprotéine bactérienne (799,800). En outre, une étude *in vitro* a montré que le miR-26a cible le TLR3 et inhibe son expression dans les macrophages de rat (801). En ce qui concerne le TLR5, auquel nous nous intéressons tout particulièrement, une publication a montré une relation entre le miR146-a et le TLR5, avec une surexpression d'un facteur 12 du miR-146a en réponse à la stimulation des monocytes par la flagelline, mais sans preuve de l'action directe de ce miARN sur l'expression du TLR5 (802). De même, dans une autre étude, les miR-378, miR-339, let7i et miR-222 sont surexprimés dans des monocytes humains en réponse à la flagelline de Salmonelle (803).

La régulation par les miARN des molécules de signalisation et/ou des facteurs de transcription impliqués dans les voies de signalisation des TLR semble être plus efficace que le ciblage direct de ces TLRs. En effet, comme expliqué dans le chapitre III.1.1. Voies de signalisation associées aux TLRs, les TLRs recrutent de nombreux types de protéines qui sont impliquées dans leurs voies de signalisation après leur activation par fixation du ligand spécifique. Ces protéines comprennent des molécules adaptatrices comme MyD88, des protéines kinases telles que les kinases de la famille IRAK et des ligases ubiquitaires dont la famille TRAF. Récemment, il a été montré que ces molécules représentent des cibles pour un grand nombre de miARN, en particulier pour ceux induits par les TLRs (797,804). Par exemple, comme indiqué précédemment le miR-146a inhibe IRAK1 et TRAF6 protéines essentielles pour l'activation des voies de signalisation MyD88-dépendantes (773,805). De même, le miR-146b peut moduler la signalisation du TLR4 en ciblant plusieurs protéines dont TLR4, MyD88, IRAK1 et TRAF6, conduisant à une diminution de la production de plusieurs cytokines et chemokines pro-inflammatoires (806). D'autres miARN sont également impliqués dans le contrôle de l'inflammation. Les miR-132 et miR-212 ciblent IRAK4 et diminuent ainsi la production des cytokines pro-inflammatoires (807). Le miR-155 cible surtout des protéines appartenant à la voie de signalisation de NF- κ B, comme IKK (*kinases I κ B*) et IKK ϵ , ainsi que la protéine p38 de la voie de signalisation des MAPK, et inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules dendritiques humaines en réponse aux stimuli microbiens (775).

Les miARN peuvent également agir au niveau des facteurs de transcription activés par la signalisation des TLRs, dont NF- κ B, AP-1, STAT et IRF, inhibant ainsi l'expression des gènes induits par les TLRs. Par exemple, le facteur NF- κ B est ciblé directement par certains miARN, dont le miR-9 dans des neutrophiles humains et le miR-210 dans des macrophages de souris, après stimulation du TLR4 par du LPS (776,808). Une étude récente a également démontré que le miR-210 peut cibler le facteur NF- κ B1 sous induction par le LPS dans les macrophages murins (808). De plus, le miR-329 joue un rôle central dans l'inhibition de l'expression de l'ARNm de l'IL-6 en ciblant la sous unité p65 du facteur NF-

κB (809). D'autres facteurs sont également ciblés par les miARN comme STAT3, inhibé par le miR-223 ce qui conduit à l'inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1β dans les macrophages (810).

Les cytokines jouent un rôle important dans l'éradication des agents pathogènes infectieux et le recrutement de cellules inflammatoires sur le site de l'infection pour une défense de l'hôte efficace. Les miARN peuvent cibler également les ARNm des cytokines induites par des TLRs activés dont les IFN-I (interférons de type I), TNF (*tumor necrosis factor*), IL-6, IL-12 et IL-10 (811). Par exemple, le miR-466l peut se lier directement à la région 3'-UTR de l'ARNm de l'IFN-α réduisant ainsi son expression lors d'une infection virale par le VSV (*vesicular stomatitis virus*) (812). De plus, les miR-26a, miR-34a, miR-145 et let-7b régulent directement l'expression de l'IFN-β en ciblant la région 3'-UTR de l'IFN-β (813,814). D'autre part, certaines cytokines telles que les IFN de type I peuvent également affecter l'expression des miARN. Par exemple, l'activation de l'IFN-α peut inhiber deux miARN fortement exprimés, les miR-378 et miR-30e. Cette suppression permet la libération d'ARNm cytolytiques, entraînant une augmentation de la cytotoxicité des cellules tueuses naturelles (815). De même, l'ARNm du TNF contient un site de liaison qui peut être ciblé par le miR-125b dans les macrophages RAW 264.7 de souris (816). Il a été également montré que l'IL-6 peut être ciblée par plusieurs miARN tels que les miR-16, miR-365 et miR-142-3p, réduisant par la suite la mortalité induite par les endotoxines en limitant la signalisation TLR par un mécanisme de rétrocontrôle (814,817,818).

La stabilité des protéines est très importante pour leur fonction biologique. Des preuves indiquent que les miARN coopèrent avec les protéines liant l'ARN (RBP), régulent la stabilité de nombreux ARNm codant les cytokines et/ou leur traduction par les éléments riches en AU (ARE) de leurs régions 3'-UTR. Par exemple, les ARNm du TNF et de l'IL-10 contiennent de longs ARE ciblés par la tristétraproline (TTP), facteur clé de la déstabilisation de l'ARNm en aval de la voie de signalisation des TLR (819,820). Ainsi, le miR-16 coopère avec la TTP pour médier la déstabilisation de l'ARNm (821). De plus, une étude récente a montré que l'ARNm du TNF est directement dégradé par le miR-221, le miR-579 et le miR-125b avec la TTP, conduisant à la tolérance au LPS (816,822). Parmi ces miARN, le miR-221 interagit avec la TTP pour accélérer la dégradation de l'ARNm du TNF, tandis que le miR-579 et le miR-125b se combinent à la TTP pour bloquer la traduction de l'ARNm du TNF (816,822).

Les miARN interviennent donc à de nombreux niveaux des voies de signalisation des TLRs, dans un ordre chronologique précis, permettant une régulation et un contrôle optimal de la réponse inflammatoire, afin de prévenir les dommages résultant d'une réponse pro-inflammatoire excessive.

IV.9. MicroARN et thérapeutique

Les miARN représentent une piste active de recherche et l'avancée rapide des connaissances dans ce domaine révèle l'importance de ces petites molécules d'ARN régulatrices. Le rôle des miARN dans de nombreuses maladies a été étudié et caractérisé et plusieurs miARN sont devenus des candidats intéressants pour une utilisation diagnostique et thérapeutique. L'absence d'effets délétères sur les tissus normaux fait de ces molécules une nouvelle génération potentielle de médicaments. Ces dernières années, un grand nombre de recherches a été initié afin de développer une nouvelle thérapie basée sur les miARN suivant deux stratégies distinctes : a) l'inhibition de leur activité, grâce à l'utilisation d'antagonistes de miARN, et b) l'amplification de leur activité, grâce à l'utilisation de miARN mimiques (823).

Au cours de la dernière décennie, le nombre de brevets délivrés à des sociétés biopharmaceutiques a considérablement augmenté. Par conséquent, l'obtention de droits de brevet pour les produits thérapeutiques à base d'ARN est un domaine important. Dans la base de données de brevets de Delphion, 1 661 documents de brevets américains liés aux miARN ont été trouvés (824,825). Les documents de brevet relatifs aux miARN couvrent environ 60 catégories de codes IPC (*International Patent Classification*). Près de 50 % des brevets américains ont été classés dans la catégorie de préparations médicinales consistant en des compositions pharmaceutiques qui regroupent des composés modulant les miARN ou des procédés liés à la modulation de l'activité des miARN pour le traitement de maladies. Les chercheurs décrivent également un grand nombre de demandes de brevet liées à des méthodes de traitement du cancer, beaucoup plus que pour toute autre maladie. Les auteurs montrent également que le premier brevet basé sur les miARN a été publié en Europe en 2008 (826).

Les industries biopharmaceutiques investissent dans le développement des miARN et de siRNAs thérapeutiques. Plusieurs industries biopharmaceutiques, telles que *Alnylam Pharmaceuticals*, *Rosetta Genomics* et *Regulus Therapeutics*, ont été créées au cours des 25 dernières années. Ces sociétés biopharmaceutiques investissent dans le développement de molécules thérapeutiques à base de miARN et de siRNAs. Cependant, il existe un défi pour les petites entreprises de biotechnologie, car il existe une certaine volatilité financière dans ce domaine (827,828). Les grandes industries pharmaceutiques collaborent avec des petites entreprises pour développer des molécules destinées à la recherche et développement (R&D) dans le cadre d'essais cliniques. Ces sociétés investissent dans ce nouveau domaine pour entrer sur le marché avec de nouvelles molécules thérapeutiques à base de miARN et de siRNAs dès que possible.

Depuis plusieurs années, des essais cliniques sur des traitements à base de miARN se développent (Tableau 1). Les nouvelles sociétés ont mis au point des miARN thérapeutiques pour des indications particulières. Ces sociétés comprennent *miRagen Therapeutics*, *Regulus Therapeutics* et *MiARN Therapeutics*.

Tableau 1. Des microARN en phase de développement, leur indication et leur société biopharmaceutique (829).

Therapeutic miRNAs	Indication	Biopharmaceutical Company	Remarks
Miravirsen	the indication of the hepatitis C virus (HCV) infection	Santaris Pharma	phase IIa clinical trial
MRX34	for the treatment of a variety of cancers such as colon cancer, non-small-cell lung cancer (NSCLC), hepatocellular carcinoma, cervical cancer, ovarian cancer, etc.	Mirna Therapeutics	phase 1 clinical trial halted because of immune responses
RG-101	for the treatment of HCV	Regulus Therapeutics	an owned GalNAc-conjugated anti-miR
RG-012	for the treatment of Alport syndrome	Regulus Therapeutics	in the pipeline to initiate clinical trial phase II
MGN-1374	for the treatment of post-myocardial infarction remodeling	miRagen Therapeutics	targets miR-15 and miR-195; it is in the preclinical stage
MGN-2677	for the treatment of vascular disease	miRagen Therapeutics	targets miR-143/145; it is in the pipeline
MGN-4220	for the treatment of cardiac fibrosis	miRagen Therapeutics	targets miR-29; it is in the pipeline
MGN-4893	for the treatment of disorders like abnormal red blood cell production such as polycythemia vera	miRagen Therapeutics	targets miR-451; it is in the pipeline
MGN-5804	for the treatment of cardiometabolic disease	miRagen Therapeutics	targets miR-378; it is in the pipeline
MGN-6114	for the treatment of peripheral arterial disease	miRagen Therapeutics	targets miR-92; it is in the pipeline
MGN-9103	for the treatment of chronic heart failure	miRagen Therapeutics	targets miR-208; it is in the pipeline

Par exemple, Miravirsen est un oligonucléotide antisens constitué de phosphorothioate et d'ADN modifié par LNA (*LNA-modified DNA phosphorothioate antisense oligonucleotide*) (ASO) qui inhibe le miR-122 (830,831). Il s'agit du premier médicament ciblant les miARN à être entré en essais cliniques de phase II pour tester son innocuité et sa tolérance chez des patients. Ce médicament est développé par *Santaris Pharma* (Centre d'Innovation Roche). Les essais cliniques ont été réalisés pour son utilisation contre l'infection par le virus de l'Hépatite C. Outre les États-Unis, l'essai clinique de phase IIa est également en cours dans plusieurs autres pays, notamment aux Pays-Bas, en Allemagne, en Pologne, en Roumanie et en Slovaquie. L'essai étudie le Miravirsen en association avec le télaprévir et la ribavirine chez des patients infectés par le VHC répondeurs à l'interféron pégylé et à la ribavirine.

Plusieurs miARN peuvent agir en tant que gènes suppresseurs de tumeurs dans les cancers humains, comme le miR-34 (832,833). MRX34 délivre un mimique du miR-34 qui agit comme un suppresseur de tumeur. Ce médicament peut être utilisé pour le traitement d'une grande variété de cancers, tels que le cancer du côlon, le cancer du poumon, le carcinome hépatocellulaire, le cancer du col de

l'utérus et le cancer de l'ovaire. MiARN Therapeutics est la société biopharmaceutique qui réalise l'essai clinique de phase 1 MRX34 sur les cancers du foie.

D'autres miARN sont également en cours d'essais préclinique. *miRagen Therapeutics* est une société biopharmaceutique basée aux États-Unis qui développe des thérapies innovantes ciblant l'ARN, avec un accent particulier sur les miARN pour répondre aux besoins non satisfaits en matière de santé humaine. *miRagen Therapeutics* développe plusieurs agents thérapeutiques à base de miARN, notamment MGN-1374, MGN-2677, MGN-4220, MGN-4893, MGN-5804, MGN-6114, MGN-8107 et MGN-9103. MGN-9103 a été proposé pour ses rôles dans le diabète et l'obésité. L'obésité, le diabète de type 2 et l'insuffisance cardiaque sont associés à un métabolisme cardiaque anormal. Il a été noté que le miR-208 ciblant le gène MED13 spécifique du cœur favorise une résistance à l'obésité induite par un régime riche en graisses et produit une sensibilité à l'insuline et une tolérance au glucose chez la souris (834). Le MGN-9103 est un ASO modifié par le LNA (835). Le miR-208 est utilisé pour traiter l'insuffisance cardiaque persistante, et il est localisé dans un intron du gène alphaMHC. C'est un miARN spécifique du cœur qui est nécessaire au développement de l'hypertrophie cardiaque, la fibrose et les modifications de la myosine (836,837). Un autre médicament de *miRagen Therapeutics* est le MGN-4893, qui cible le miR-451. Ce miARN est requis pour l'expansion des globules rouges. L'inhibition du miR-451 chez la souris, en utilisant l'anti-miR-451, a bloqué la différenciation érythrocytaire, ce qui était utile pour le traitement des troubles liés à la production anormale de globules rouges (838–840). Le miR-21 joue un rôle important dans les maladies fibrogènes dans différents organes, y compris les reins. Par conséquent, les oligonucléotides anti-miARN-21 peuvent prévenir la néphropathie d'Alport (602). RG-012, un anti-miR ciblant le miR-21, est une molécule de *Regulus Therapeutics* dans le pipeline d'essais cliniques pour le traitement du syndrome d'Alport. Cette maladie est une maladie rénale génétique potentiellement mortelle qui n'a actuellement pas de traitement approuvé (841).

Les résultats de travaux expérimentaux présentés dans les parties suivantes de ce manuscrit tendent à montrer, dans un premier lieu, un rôle des flagelles de *C. difficile* dans le développement d'une réponse immunitaire inflammatoire délétère pour l'hôte. Nous nous sommes focalisés ensuite principalement sur l'étude de la régulation de cette réponse inflammatoire par les microARN. Des travaux *in vitro* et *in vivo* ont permis l'identification d'un microARN jouant un rôle anti-inflammatoire et régulant la voie signalisation de NF- κ B liée à l'infection à *C. difficile*. Les résultats obtenus suggèrent une utilisation potentielle du mimique de ce miARN pour le traitement de l'inflammation au cours des ICD et motivent la poursuite de l'étude du mécanisme d'action de ce miARN et de ces cibles ainsi que du développement pharmaceutique de ce mimique.

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

TRAVAUX PERSONNELS

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

OBJECTIFS SCIENTIFIQUES

CONFIDENTIEL

Travaux personnels

I. Objectifs scientifiques

Ce travail de thèse est divisé en deux parties. La première sera consacrée à l'étude du rôle *in vivo* de la flagelline FliC dans la réponse inflammatoire lors de l'infection par *C. difficile*. Dans la deuxième partie, nous nous pencherons sur la régulation de cette réponse inflammatoire par certains microARN.

- I. Etude *in vivo* du rôle pro-inflammatoire de la flagelline de *C. difficile* après son interaction avec le récepteur TLR5 de l'hôte
 - a. Caractérisation de la réponse inflammatoire dans la muqueuse intestinale dans un modèle murin d'ICD (souris à microbiote conventionnel) infecté par différentes souches (sauvages et mutants) de *C. difficile* ainsi que dans un modèle de souris KO *tlr5^{-/-}* par analyse anatomopathologique.
 - b. Analyse de l'activation de la voie de signalisation pro-inflammatoire de NF-κB et étude de l'expression de gènes impliqués dans la voie de signalisation du TLR5 dans les modèles murins d'ICD à microbiote conventionnel et de souris KO *tlr5^{-/-}*.
- II. Etude de la régulation de l'inflammation induite par *C. difficile* par les microARN
 - a. *In vitro* :
 - i. Etude de l'expression des miARN, spécifiquement induite par la flagelline FliC, dans un modèle de cellules épithéliales intestinales Caco-2.
 - ii. Etude du rôle d'un miARN sur-exprimé (miR-27a-5p) dans la régulation de la voie de signalisation de NF-κB

b. *In vivo* :

- i. Etude de l'expression des miARN préalablement identifiés *in vitro* dans le caecum du modèle murin de l'ICD (souris à microbiote conventionnel) et des souris KO *tlr5*^{-/-} infectées par *C. difficile*.
- ii. Etude du rôle de l'analogue synthétique du miR-27a-5p dans la régulation de l'inflammation intestinale induite par *C. difficile* dans le modèle murin de l'ICD

CONFIDENTIEL

PUBLICATION 1

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

II. Publication 1

***Clostridium difficile* flagella induce a pro-inflammatory response in intestinal epithelium in synergy with toxins.**

Jameel Batah*, Hussein Kobeissy*, Phuong Trang Bui Pham, Cécile Denève Larrazet, Sarah Kuehne, Anne Collignon, Jean-Christophe Marvaud, Imad Kansau.

*Ces deux auteurs ont contribué d'une manière égale

Très peu de données de la littérature montrent le rôle des flagelles et de la flagelline FliC de *C. difficile* dans la stimulation du TLR5 et dans l'induction d'une réponse immunitaire de l'hôte lors de l'infection par la bactérie. Une étude récente dans un modèle de cellules HT29 et Caco-2 a montré que le prétraitement des cellules par la toxine TcdB augmente la production de cytokines induite par la flagelline de *C. difficile*, suggérant que la toxine faciliterait l'accès de la flagelline au TLR5 localisé au pôle basolatéral des cellules épithéliales. De plus, dans cette même étude, la flagelline de *C. difficile* induisait l'activation des voies NF- κ B et p38 (MAPK) via son interaction avec le TLR5, ainsi que la production d'IL-8 et de CCL20. Récemment, nous avons rapporté dans un modèle de cellules épithéliales polarisées MDCK exprimant le récepteur TLR5 (MDCK-TLR5) et dans un modèle de cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2, que la souche R20291 de *C. difficile* ainsi que sa flagelline FliC purifiée activent principalement la voie de signalisation de NF- κ B, et à un moindre degré les voies des MAPKs ERK1/2, JNK et p38 via le TLR5.

Cependant, aucune étude n'a montré à ce jour le rôle des flagelles de *C. difficile* dans l'inflammation intestinale lors de l'infection *in vivo*. L'ensemble des résultats obtenus *in vitro*, montrant un rôle des flagelles de *C. difficile* dans la réponse inflammatoire épithéliale de l'hôte, nous a conduit à analyser le rôle des flagelles dans la réponse inflammatoire intestinale *in vivo* dans un modèle murin d'ICD.

Les résultats que nous avons obtenus sont décrits ci-dessous :

Les souches toxigènes et flagellées de *C. difficile*, contrairement aux mutants non-toxinogènes ou non-flagellés ou exprimant un flagelle paralysé, induisent une réponse inflammatoire caecale dans un modèle murin d'ICD.

Afin d'étudier le rôle *in vivo* de la flagelline FliC de *C. difficile* dans l'induction d'une réponse inflammatoire intestinale, nous avons constitué quatre groupes de souris à microbiote intestinal conventionnel : le premier groupe infecté par la souche sauvage épidémique R20291 de *C. difficile*, un groupe infecté par son mutant isogénique non flagellé (FliC⁻), un troisième groupe infecté par le mutant non toxigène (A⁻B⁻) n'exprimant pas les deux toxines TcdA et TcdB, et un dernier groupe infecté par un mutant isogénique immobile (MotB⁻, muté dans le gène *motB* codant le moteur du flagelle) possédant un flagelle paralysé. Les souris infectées par la souche sauvage ont développé une diarrhée dès le premier jour post-infection (J1), et ont présenté une activité réduite avec le poil hérissé au deuxième jour de l'infection (J2), ainsi qu'un taux de mortalité de 50 % et une inflammation caecale importante. En revanche, les souris infectées par le mutant toxigène non flagellé (FliC⁻) ou le mutant non toxigène flagellé (A⁻B⁻) ont développé des manifestations cliniques et une inflammation caecale considérablement réduites. Aucun décès n'a été constaté dans ces groupes. D'autre part, les souris infectées par le mutant paralysé (MotB⁻) ont développé une ICD avec une sévérité et une mortalité similaires à celles développées par les souris infectées par la souche sauvage, suggérant que la présence des toxines et des flagelles est nécessaire au développement d'une forme sévère d'ICD dans ce modèle murin. Les quatre groupes de souris présentaient le même niveau de colonisation fécale et d'activité cytotoxique (pour les souches toxigènes) dans les fèces, confirmant la colonisation intestinale et la production des toxines équivalentes par les mutants non-flagellé (FliC⁻) et immobile (MotB⁻). L'ensemble de ces résultats suggèrent une synergie entre les toxines et les flagelles dans l'induction de la réponse inflammatoire intestinale par *C. difficile*, puisque, ni les toxines, ni les flagelles n'étaient pas capables d'induire seuls la réponse clinique observée chez les souris infectées par la souche sauvage.

Ces résultats ont été reproduits lorsque les souris ont été infectées par une autre souche de *C. difficile* la souche 630Δerm et ses mutants respectifs FliC⁻ (non flagellé) et A⁻B⁻ (non toxigène). Ainsi, malgré une virulence moindre induite par cette souche par rapport à la souche R20291, les toxines seules ou les flagelles seuls là encore n'ont pas été suffisants pour le développement d'une réponse inflammatoire chez les souris. Ces observations montrent le rôle important du flagelle de *C. difficile* dans lésions intestinales induites dans ce modèle murin d'ICD.

L'absence du récepteur TLR5 réduit considérablement l'inflammation caecale induite par l'infection à *C. difficile*.

Nous avons également étudié le rôle du récepteur TLR5 dans la réponse inflammatoire induite par le flagelle de *C. difficile*. Pour cela, nous avons utilisé un modèle d'ICD sur des souris KO *tlr5*^{-/-} qui n'expriment pas le récepteur TLR5 dans la muqueuse intestinale. Les souris ont été infectées par la souche R20291 sauvage, par son mutant isogénique non flagellé (FliC⁻) ou par la souche 630Δ*erm* sauvage. Toutes les souris de ces trois groupes ont survécu au deuxième jour après l'infection, et n'ont pas développé d'inflammation caecale (à l'exception d'un œdème muqueux, probablement induit par les toxines TcdA et TcdB). Ces résultats confirment l'interaction entre le flagelle et le récepteur TLR5 dans la réponse pro-inflammatoire intestinale induite par *C. difficile* et son implication dans les manifestations cliniques de l'ICD.

Les flagelles de *C. difficile* en présence des toxines induisent l'activation de la voie de signalisation de NF-κB dans le caecum du modèle murin d'ICD.

L'infection des souris à microbiote conventionnel par les souches R20291 et 630Δ*erm* sauvages induit l'activation de la voie de NF-κB dans le caecum des animaux. Cette activation n'a pas été observée lorsque les souris sont infectées par les souches non flagellées ou non toxigènes. Ces aspects ont été observés à la fois au niveau protéique et transcriptomique. Ainsi, une dégradation importante de la protéine IκB (inhibiteur du complexe NF-κB) a été observée dans les tissus caecaux des animaux infectés par la souche sauvage mais pas par les souches non flagellées ou non toxigènes. De même, une surexpression des gènes des cytokines pro-inflammatoires KC (équivalent d'IL-8 humaine), IL-6, IL-1B, IL-22, CXCL-10 et TNF-α a été uniquement observée chez les souches toxigènes et flagellées. L'activation de la voie de NF-κB n'a pas été observée dans le caecum des souris KO *tlr5*^{-/-} ce qui va dans le même sens du rôle de l'interaction flagelle-TLR5 dans la réponse de l'hôte. En revanche, nous n'avons pas mis en évidence un rôle de flagelle de *C. difficile* dans l'activation des voies de MAPKs dans ce modèle murin d'ICD, suggérant que d'autres produits bactériens, dont les toxines, activent ces cascades de signalisation. Le rôle éventuel des voies des MAPKs dans la réponse inflammatoire au cours des ICD devra être davantage exploré.

Conclusion

L'ensemble de nos résultats montre qu'*in vivo*, dans le modèle murin d'ICD, le flagelle de *C. difficile* joue un rôle primordial dans la réponse pro-inflammatoire intestinale. En revanche, les toxines à elles seules, bien que connues pour induire des voies de signalisation cellulaires dont celle des MAPKs, ne semblent pas suffisantes pour induire le degré d'inflammation observé dans le modèle animal d'ICD

utilisé dans notre étude. En effet, nous suggérons l'hypothèse que dans la situation pathologique de dysbiose et de colonisation intestinale par *C. difficile*, les toxines vont perturber la barrière épithéliale intestinale provoquant l'ouverture des jonctions serrées, ce qui permettrait à la flagelline d'accéder aux cellules épithéliales et d'entrer en contact avec le récepteur TLR5, principalement localisé au pôle basolatéral de ces cellules. Cette interaction entrainerait l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires, notamment celle de NF- κ B, principalement responsable des lésions tissulaires observées. Ainsi, à l'aide de différents mutants bactériens, nous avons montré que le flagelle de *C. difficile* serait responsable, en synergie avec les toxines, du développement d'une réponse inflammatoire délétère pour l'hôte.

CONFIDENTIEL

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Clostridium difficile flagella induce a pro-inflammatory response in intestinal epithelium of mice in cooperation with toxins

Jameel Batah¹, Hussein Kobeissy¹, Phuong Trang Bui Pham¹, Cécile Denève-Larrazet¹, Sarah Kuehne², Anne Collignon¹, Claire Janoir-Jouveshomme¹, Jean-Christophe Marvaud¹ & Imad Kansau¹

Clostridium difficile is the most important enteropathogen involved in gut nosocomial post-antibiotic infections. The emergence of hypervirulent strains has contributed to increased mortality and morbidity of CDI. The *C. difficile* toxins contribute directly to CDI-associated lesions of the gut, but other bacterial factors are needed for the bacteria to adhere and colonize the intestinal epithelium. The *C. difficile* flagella, which confer motility and chemotaxis for successful intestinal colonization, could play an additional role in bacterial pathogenesis by contributing to the inflammatory response of the host and mucosal injury. Indeed, by activating the TLR5, flagella can elicit activation of the MAPK and NF- κ B cascades of cell signaling, leading to the secretion of pro-inflammatory cytokines. In the current study, we demonstrate, by using an animal model of CDI, a synergic effect of flagella and toxins in eliciting an inflammatory mucosal response. In this model, the absence of flagella dramatically decreases the degree of mucosal inflammation in mice and the sole presence of toxins without flagella was not enough to elicit epithelial lesions. These results highlight the important role of *C. difficile* flagella in eliciting mucosal lesions as long as the toxins exert their action on the epithelium.

The Gram-positive anaerobic bacterium *Clostridium difficile* is responsible for intestinal nosocomial post-antibiotic infections in developed countries. The clinical features of *C. difficile* infection (CDI) include diarrhea, moderately serious disease, and severe pseudomembranous colitis. The major risk factors associated with CDI are antibiotic exposure, hospitalization, and advanced aged¹. A dramatic increase of severe disease and mortality of CDI have been observed in North America, Europe and Australia^{2,3}, mainly resulting from the emergence of highly virulent and epidemic *C. difficile* strains^{3,4}.

The *C. difficile* toxins TcdA and TcdB are largely involved in lesions of the gut observed during CDI^{5,6}, but other factors such as adhesins⁷⁻¹⁰, hydrolytic enzymes^{11,12}, the S-layer proteins¹³, and cell wall proteins⁹, are needed for the bacteria to adhere and colonize the gut. The *C. difficile* flagella confer motility and chemotaxis for successful intestinal colonization following disruption of the bacterial microbiota^{14,15}. However, flagella could play an additional role in bacterial pathogenesis by contributing to the inflammatory response of the host and mucosal injury. Indeed, flagellin, the principal component of bacterial flagella, is recognized by the Toll-like receptor 5 (TLR5)¹⁶, one of the Pattern Recognition Receptor (PRR) involved in innate immune response, which is mostly localized at the basolateral pole of intestinal cells. The TLR5-flagellin interaction triggers activation of the MAPK and NF- κ B cascades of cell signaling, leading to the secretion of pro-inflammatory cytokines^{17,18}.

To date, few studies have addressed this role for *C. difficile* flagella. Yoshino *et al.* showed that *C. difficile* flagellin induces activation of NF- κ B and the p38 MAPK, thus promoting the synthesis of IL-8 and CCL20 in intestinal epithelial cells¹⁹. These authors showed that a pretreatment with toxin TcdB enhances the flagellin-induced cytokine production by cells. Recently, we reported that the interaction of *C. difficile* flagellin and TLR5

¹Faculté de Pharmacie, "Unité Bactéries Pathogènes et Santé" (UBaPS), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry Cedex, France. ²School of Dentistry, College of Medical and Dental Sciences, The University of Birmingham, Birmingham, B5 7EG, UK. Jameel Batah and Hussein Kobeissy contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to I.K. (email: imad.kansau@u-psud.fr)

the score of the WT-infected mice group (score 12) compared to that of the other two groups (*fliC* and A⁻B⁻ mutant-infected mice, scores 8 and 6 respectively) and control (score 0, Fig. 1F). The analysis of each inflammation criteria separately also showed (except for edema) a statistically significant difference ($P < 0.01$) between the WT-infected mice and the other two groups (Fig. 1G).

Toxigenic and flagellum-paralyzed *C. difficile* R20291 mutant induces a caecal inflammatory response in mice. In order to test the role of flagellum in the epithelial inflammatory response we also performed *in vivo* experiments using a *motB* mutant in R20291 strain which is toxigenic and flagellated but not mobile. The *motB* gene is involved in synthesis of the flagellar motor. Interestingly, all mice infected with the paralyzed flagella *motB* mutant ($n = 10$) developed CDI with a high (50%) mortality rate, a strong colitis with significant caecal dilatation, luminal liquid accumulation and wall hyperemia as observed in the WT R20291-infected mice. Indeed, as for WT R20291-infected mice, mice infected with the flagella paralyzed *motB* mutant showed the highest inflammation score (12 out of 15) in caecal sections compared to uninfected mice (Fig. 1E), with a statistically significant difference ($P < 0.01$) between the score of the *motB* mutant-infected mice group (score 12) and those of the other two groups (*fliC* and A⁻B⁻ mutant-infected mice, scores 8 and 6 respectively) and control (score 0, Fig. 1F). The individual inflammation criteria were similar to those of the WT-infected mice and a statistically significant difference ($P < 0.01$) between the *motB*-infected mice and the other two groups was observed (Fig. 1G).

To note, in all performed experiments, the differences observed between the different groups of animals were not due to differences in the rate of fecal colonization since the fecal shedding of vegetative forms and spores reached by these strains were similar for the 4 groups of mice at days 1 and 2 post-infection (Supplementary Fig. S1A,B). Moreover, as expected, the feces from WT strain, *fliC* and *motB* mutant-infected mice, but not those from A⁻B⁻ mutant-infected mice, showed a strong and similar level of cytotoxic activity (Supplementary Fig. S2A), thus indicating that *in vivo* toxin production of the WT R20291 strain and its respective *fliC* and *motB* mutants are quite comparable.

Taken together, these observations suggest that, in presence of toxins TcdA and TcdB, the flagellum of the *C. difficile* R20291 strain plays an important role in amplifying the intestinal inflammatory response during infection, and that these toxins are necessary for the pro-inflammatory activity of flagella in this CDI animal model.

Flagella and toxins in non-epidemic *C. difficile* 630 Δ *erm* strain are also necessary to induce a caecal inflammatory response in the CDI mouse model. To evaluate a potential strain-dependent effect for FliC-induced caecal inflammation, we performed the same animal experiments using the non-epidemic *C. difficile* 630 Δ *erm* strain and its respective *fliC* and A⁻B⁻ mutants. As for R20291 derivatives, comparable fecal shedding was observed for all 630 Δ *erm* derivative strains (Supplementary Fig. S1C,D) and a cytotoxic activity was detected in feces of the WT 630 Δ *erm*- and the *fliC* mutant-infected mice, while no cytotoxicity was detected in feces of the A⁻B⁻ mutant-infected animals (Supplementary Fig. S2B). In contrast, *in vivo* cytotoxicity was dramatically lower in *C. difficile* WT 630 Δ *erm*-infected mice (600 U), compared to that observed in the R20291-infected animals (40 000 U), which is in accordance with the different clinical outcomes observed between these animal sets. Indeed, the flagellated WT 630 Δ *erm* induced CDI with soft stools, but a moderated degree of caecal mucosa inflammation compared to uninfected mice (Fig. 2A,B), and the inflammation level was lower (score 8.5, Fig. 2E,F) than that observed in the WT strain R20291-infected mice (score 12). Even if an important submucosa edema was observed, the degree of neutrophil infiltrate, epithelial injury and loss of goblet cells was considerably reduced in caecal sections of 630 Δ *erm* WT-infected mice compared to sections of R20291-infected mice. Moreover, as for the *fliC* mutant in R20291, the 630 Δ *erm* *fliC* and A⁻B⁻ mutants did not induce disease and elicited only a weak degree of caecal mucosa inflammation (Fig. 2C,D) as measured by histological scores (Fig. 2E,F). These results suggest that flagella of two different epidemic and non-epidemic *C. difficile* strains contribute with toxins to caecal inflammation during infection in mice, despite major differences in the intensity of the inflammation induced by the two strains.

The absence of TLR5 strongly reduces the *C. difficile* infection-induced caecal inflammation of mice. In order to analyze the role of the mucosal TLR5 in the *C. difficile* flagella-induced inflammatory response, we tested the CDI model in C57BL/6 *tlr5*^{-/-} KO mice, which do not express TLR5 in the intestinal mucosa. Mice were infected by oral gavage with the *C. difficile* R20291 WT strain ($n = 10$) or its *fliC* (unflagellated but toxigenic) mutant ($n = 10$), as well as with the 630 Δ *erm* WT strain ($n = 10$) and the clinical outcome and caecal lesions were analyzed. No infected *tlr5*^{-/-} KO mice developed CDI and all animals survived at day 2 post-infection regardless of the strain. Neither colitis was observed in infected mice, compared to the group of non-infected mice ($n = 10$), and only mucosal edema was detected in histological sections from caecum of animals (Fig. 3B–D), probably induced by *C. difficile* TcdA/TcdB toxins, produced by all tested strains and detected in feces of all infected animals (Supplementary Fig. S2C). In accordance with the low level of cytotoxic activity detected in WT 630 Δ *erm*-infected mice, the lowest inflammation score was observed in animals infected by this non-epidemic strain. Altogether, these results strongly suggest that *C. difficile* flagella-TLR5 interaction leads to a pro-inflammatory response of the intestinal mucosa.

The *C. difficile* flagella, in presence of toxins, induce the NF- κ B activation in the caeca of mice. We previously showed that the NF- κ B and MAPKs signaling were activated by *C. difficile* flagellin via TLR5 in epithelial cells, with a predominant activation of the former²⁰. We thus analyzed the NF- κ B activation (I κ B- α degradation) in the intestine of mice. Significant I κ B- α degradation (2 fold) was observed in the R20291 WT-infected mice compared to the negative control (Fig. 4A). Nevertheless, non-significant I κ B- α degradation was observed in the *fliC* and A⁻B⁻ mutant-infected animals, compared to R20291 WT-infected mice (Fig. 4A). Interestingly, as for WT-infected mice, a

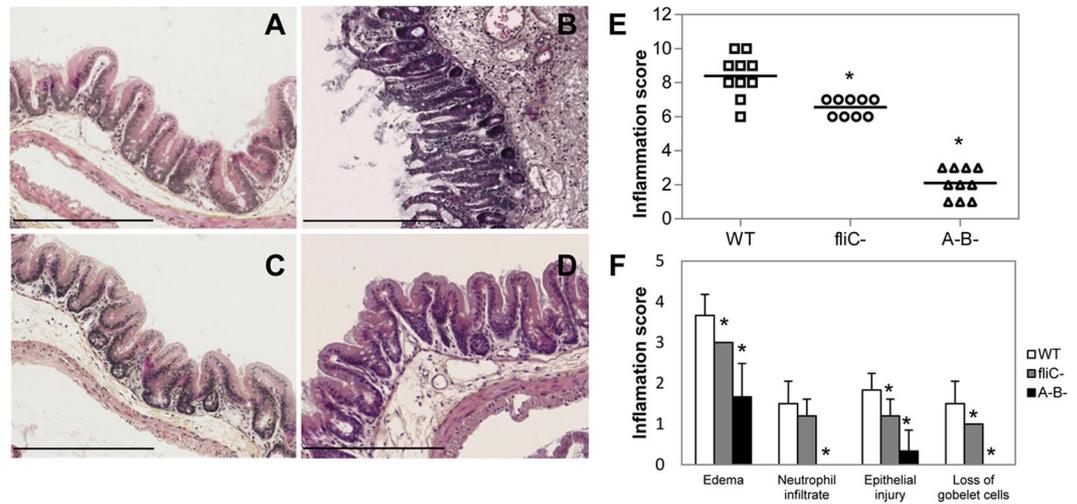


Figure 2. *C. difficile* 630 Δ *erm* flagella are involved in caecal inflammation of mice. C57BL/6 mice (n = 10) were infected by oral gavage or not and caeca were collected at the clinical end point day 2 for histology. (A) Representative histology of caecum of healthy uninfected mice (control) with epithelium integrity; (B) 630 Δ *erm* WT-infected mice with moderate desquamation, exudates and necrotic cells in the intestinal lumen, edema, and inflammatory submucosa cell infiltration; (C) *fliC* and (D) A⁻B⁻ mutant-infected mice with normal mucosa (200X magnification). Bar = 200 μ m. (E) Inflammation histological scores for individual mice in each group. The horizontal lines represent the mean scores for each group of animals. (F) Individual evaluation criteria of intestinal inflammation. The bars represent the mean scores for each group of animals and standard deviations. *P < 0.01 compared to WT-infected mice.

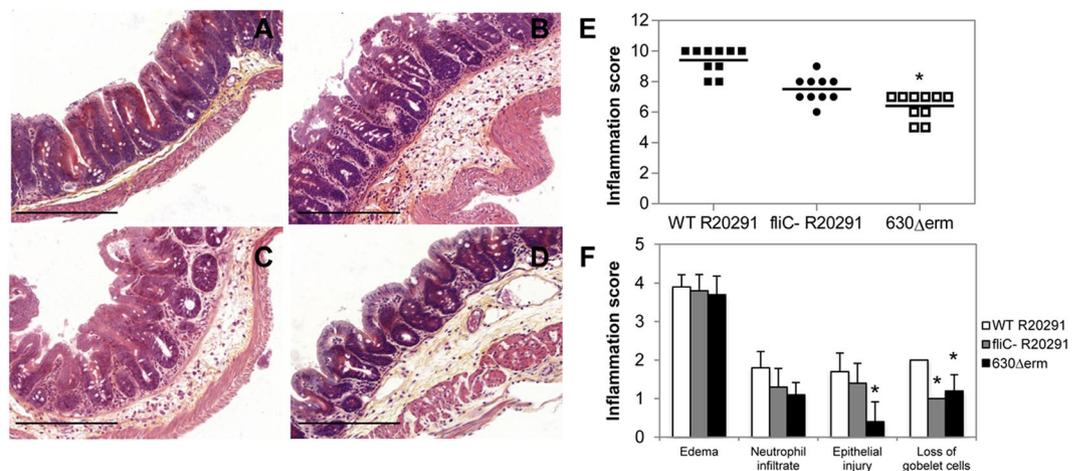


Figure 3. *C. difficile* flagella and caecal inflammation in C57BL/6 *tlr5*^{-/-} KO mice. C57BL/6 *tlr5*^{-/-} KO mice (n = 10) were infected by oral gavage or not and caeca were collected at the clinical end point day 2 for histology. (A) Representative histology of caecum of healthy uninfected mice (control) with epithelium integrity; (B) R20291 WT-infected mice with mild to moderate edema; (C) R20291 *fliC* mutant and (D) 630 Δ *erm* WT-infected mice with mild to moderate edema (200X magnification). Bar = 200 μ m. (E) Inflammation histological scores for individual mice in each group. The horizontal lines represent the mean scores for each group of animals. (F) Individual evaluation criteria of intestinal inflammation. The bars represent the mean scores for each group of animals and standard deviations. *P < 0.01 compared to R20291 WT-infected mice.

strong NF- κ B activation was observed in caeca of the *motB* mutant-infected mice compared to the negative control (Fig. 4A). We also analyzed the ERK1/2 and JNK MAPKs activation in the intestine of mice. Significant increase of ERK1/2 (1.5 fold) and JNK (2.5 fold) phosphorylation was observed in the R20291 WT- and *motB* mutant-infected mice compared to the negative control (Supplementary Fig. S3A,B). A similar level of ERK1/2 and JNK activation was also observed in the caecum of the *fliC* mutant, but not in the non-toxicogenic A⁻B⁻ mutant-infected animals (Supplementary Fig. S3A,B), suggesting a probable action of toxins which are known to also activate MAPKs in intestinal cells²². In accordance to the lesser degree of caecal inflammation observed in the 630 Δ *erm* WT-infected mice, a weak but significant activation of NF- κ B, ERK1/2 and JNK, in caecal tissue of these animals (Fig. 4B and

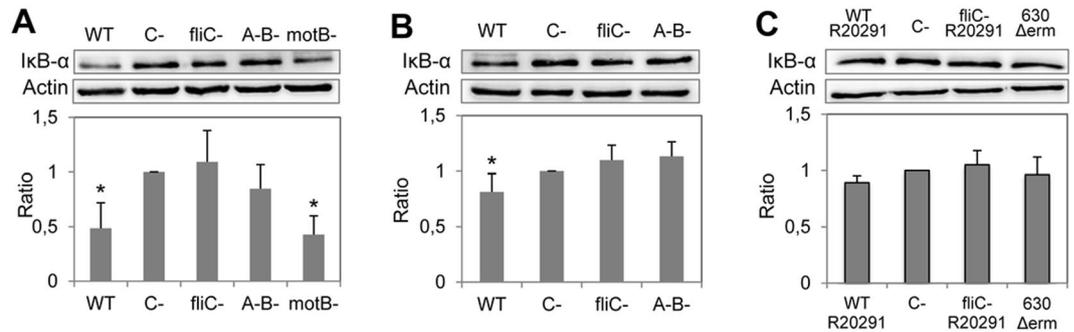


Figure 4. *C. difficile* flagella-induced degradation of I κ B- α . Caecal lysates were prepared as indicated in Material and Methods section and proteins were resolved by SDS-PAGE. (A) R20291 derivative-infected C57BL/6 mice; (B) 630 Δ *erm* derivative-infected C57BL/6 mice, and (C) R20291 derivative- or 630 Δ *erm* WT-infected C57BL/6 *tlr5*^{-/-} KO mice. Western blot were then performed using anti-I κ B- α , actin antibodies. Western blot cropped pictures (full-length blots are in the Supplementary Information file) show the results of a representative experiment. The density of the bands was measured using Fusion software. Ratios I κ B- α /actin were calculated and for the negative control (C-, uninfected mice), this ratio was normalized to 1. The ratio of the other samples was reported to the negative control. Results represent the mean (n = 10) \pm standard deviations for each group of animals. *Statistically significant differences (P < 0.05) compared to the negative control.

Supplementary Fig. S3C,D). However, no activation of these effectors was observed in caecal tissue from the *fliC* and A⁻B⁻ mutant-infected mice. Moreover, according to the role of TLR5 pro-inflammatory cell-signaling, no NF- κ B or MAPK activation was observed in caeca of *tlr5*^{-/-} KO-infected mice (Fig. 4C and Supplementary Fig. S3E,F). These results are consistent with our previous *in vitro* experiments and suggest that both TcdA/TcdB and flagella are required for NF- κ B activation in caeca of *C. difficile* infected mice.

Toxigenic and flagellated *C. difficile* strains elicit up-regulation of pro-inflammatory cytokine genes in the caeca of mice. Finally, we investigated the changes in the transcription of genes encoding pro-inflammatory cytokines in the intestinal mucosa of *C. difficile*-infected mice. We selected a set of genes whose over-expression was observed previously (Table 1)²⁰. As expected, at day 2 post-infection the KC gene encoding keratinocyte derived chemokine (equivalent of the hIL-8 in the mouse) was highly over expressed (114-fold) in the set of R20291 WT-infected mice compared to the control group of non-infected mice (Table 1). A strong up-regulation was also observed for the genes encoding the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-1 β (47- and 49-fold respectively), in accordance to the clinical and histopathological features observed in this group of animals. An up-regulation, but to a lesser extent, was shown for the genes encoding IL-22, TNF α and CXCL-10 (Table 1). Interestingly, in the *fliC* mutant-infected mice, expression of KC (hIL-8) was increased by only 17-fold and the increase of other cytokines (IL-6, IL-1 β , IL-22, CXCL-10, and TNF α), was from 2 to 9-fold, compared to the control group, suggesting a role for the flagellum of the strain R20291 in the development of this pro-inflammatory profile in the gut of infected animals. In the non-toxigenic A⁻B⁻ mutant-infected mice, a lower KC gene up-regulation was also observed (5-fold relative to the control group) as for the other genes, with the exception of the IL-1 β encoding gene that showed an over-expression slightly greater than that observed in the *fliC* mutant-infected mice (Table 1). As expected, and according to clinical and histological observations, a strong up-regulation (except for TNF α gene) was also observed for all these pro-inflammatory cytokines encoding genes in animals infected with the paralyzed flagella *motB* mutant (Table 1), strongly suggesting that the coexistence of flagella and toxins largely contributes to the mucosal injury.

We next tested the role of flagella from the non-epidemic *C. difficile* 630 Δ *erm* strain and its derivative mutants in cytokine gene up-regulation using the CDI mouse model. In accordance with clinical and histopathological observations, the flagellated WT 630 Δ *erm* induced a weak up-regulation of KC, IL-6, IL-1 β , IL-22, CXCL-10 and TNF α genes compared to the WT R20291 (Table 1). This gene up-regulation was further decreased in the 630 Δ *erm* *fliC* mutant-infected mice and completely null in the 630 Δ *erm* A⁻B⁻ mutant-infected animals, except for TNF α . These results indicate that despite differences in virulence between R20291 and 630 Δ *erm* *C. difficile* strains, both flagella and toxins contribute to the cytokine gene over-expression from intestinal mucosa in the mouse model, strongly suggesting that toxins are necessary for the contributing pro-inflammatory role of *C. difficile* flagella.

We also analyzed the pro-inflammatory cytokines gene transcription in the intestinal mucosa of the *C. difficile*-infected *tlr5*^{-/-} KO mice. The infection with the R20291 WT strain elicited a 23-fold up-regulation of KC expression compared to non-infected KO mice, which was very similar to the level of up-regulation observed in R20291 *fliC* mutant-infected conventional mice (Table 1). These results strengthen the role of flagella-TLR5 interaction in the intestinal pro-inflammatory response of the CDI animal model. A lesser up-regulation of this gene was also observed in the R20291 *fliC* mutant- and 630 Δ *erm* WT-infected *tlr5*^{-/-} KO mice (Table 1), thus suggesting that toxins, and probably other bacterial products, elicit up-regulation of pro-inflammatory cytokines genes, independently of flagella in *tlr5*^{-/-} KO mouse model.

Set of infected mice	Genes*					
	KC	IL-6	IL-1 β	IL-22	CXCL-10	TNF α
Conventional mice						
R20291 WT strain	113, 5	46, 8	49, 3	5, 7	9, 7	8, 2
R20291 <i>fliC</i> ⁻ mutant	17, 5	9, 3	7, 9	3, 7	2, 2	2, 9
R20291 A ⁻ B ⁻ mutant	5, 1	4, 9	10, 0	2, 8	1, 8	1, 6
R20291 <i>motB</i> ⁻ mutant	92, 5	39, 0	32, 4	41, 5	18, 0	5, 4
630 Δ erm WT strain	14, 9	8, 3	12, 9	4, 4	3, 5	4, 6
630 Δ erm <i>fliC</i> ⁻ mutant	8, 6	7, 4	7, 9	1, 7	3, 9	3, 9
630 Δ erm A ⁻ B ⁻ mutant	1, 5	1, 7	1, 7	1, 5	1, 7	2, 8
<i>tlr5</i> ^{-/-} KO mice						
R20291 WT strain	23, 0	3, 2	11, 1	15, 4	2, 6	6, 0
R20291 <i>fliC</i> ⁻ mutant	14, 9	1, 5	1, 0	6, 8	1, 4	1, 0
630 Δ erm WT strain	8, 4	2, 1	8, 7	8, 5	2, 2	3, 0

Table 1. Fold expression of pro-inflammatory cytokine encoding genes of *C. difficile*-infected mice. *The mean Ct from each group is reported to those of the negative control and with the expression of the GAPDH gene for each set.

Discussion

Bacterial flagella can be involved in the mucosal inflammatory injury²³. Indeed, although the surface components of bacteria in the intestinal microbiota play a role in modulating the adaptive immune response, some of these components, including flagella, from pathogenic bacteria can reach the mucosa and play a role in amplifying the inflammatory response. Flagella from some pathogens such as *Salmonella* and *Pseudomonas aeruginosa*, by specifically recognizing the innate immune pattern-recognition receptor TLR5, which is expressed at the basolateral pole of the intestinal epithelium, are responsible for inflammatory lesions in the mucosal epithelium during infection^{18, 24}. The bacterial flagellins-TLR5 interaction elicits the MAPKs and NF- κ B TLR5-related signaling pathways, thus inducing a pro-inflammatory response from host¹⁶.

The role of *C. difficile* flagella in the gut inflammatory response remains to be demonstrated. The predicted TLR5-agonist of *C. difficile* flagellin, which shares the conserved amino acids recognized by TLR5 with other mucosal pathogens, but not with flagellins known to evade TLR5^{25, 26}, was previously confirmed by studies from Yoshino *et al.* and ourselves^{19, 20}. We observed a predominant role for NF- κ B, accounting for the importance of this major transcription factor in the *C. difficile* flagellin-associated pathogenesis²⁷.

C. difficile toxins have been considered as the only pathogenic factors involved in intestinal lesions observed during CDI, and several studies have shown their role in stimulating pro-inflammatory signaling pathways²⁸. The first evidence of the contribution of *C. difficile* TcdB to the flagellin-induced inflammatory activity was reported by Yoshino *et al.*¹⁹. They hypothesize that toxin B by affecting tight junctions facilitate the access of flagellin to its receptor in polarized cell monolayers. In a recent report, Kasendra *et al.*²⁹ suggest that *C. difficile* toxins facilitate bacterial colonization by disrupting cell polarity allowing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) to access the exposed basolateral epithelial surface and trigger the production of inflammatory cytokines. Nevertheless, the synergy between toxins and other bacterial compounds involved in inflammation has never been demonstrated *in vivo*. For the first time, we show the putative role of flagella in *C. difficile* pathogenesis in a CDI mouse model²¹. In this model, we reproduced pathogenesis observed in human CDI as well as different clinical outcomes depending on two distinct clinical strains and demonstrated that the absence of flagella in toxin producing bacteria dramatically decreases the degree of mucosal inflammation in mice.

We previously reported no difference in the *in vitro* toxin gene expression between the *fliC*-R20291 mutant and its respective wild-type strain, but increased toxicity in the *fliC*-630 Δ erm flagella mutant compared to its respective WT strain³⁰. In agreement with these results, our previous *in vivo* transcriptomic analysis performed in the gnotobiotic mouse model, revealed no or weak differences in the toxin gene expression between this *fliC*-R20291 mutant and its parental wild-type strain³¹. Therefore, toxin gene regulation in absence of *fliC* is quite different between strains 630 and R20291 and the high mortality previously observed in the monoxenic mice infected by the *fliC*-R20291 mutant might be explained not by an increase in toxin gene expression but by the regulation of other genes whose expression is dependent on flagella³¹. In the present work, we used a different mouse model, the conventional mouse model²¹, much closer to the human CDI, in which both R20291 and 630 Δ erm strains and their respective *fliC* mutants induced similar cytotoxicity titer levels in feces.

In this study, the presence of toxins without the flagella was not enough to elicit the high degree of epithelial lesions observed in WT R20291-infected mice. The absence of flagella or motility could prevent the *fliC* R20291 mutant to reach the mucosa and thus to produce inflammatory lesions induced by toxins alone. However, in our study, we found levels of fecal colonization and cytotoxic activity in feces in the unflagellated (*fliC*) and non-motile (*motB*) mutant-infected mice, which were similar to those observed in the WT R20291-infected mice, thus reflecting successful intestinal colonization by these flagellar mutants in this CDI model. Moreover, the flagella-paralyzed *motB* mutant was not only able to colonize the mucosa, but also to produce toxins and elicit mucosal lesions as the WT strain. Therefore, in the context of the natural CDI, even if other bacterial factors, bacterial fitness or metabolic adaptation capability could play a role in the pathogenesis, flagella highly contribute to the development of a detrimental inflammatory host response and the outcome of CDI as long as

toxins exert their action on the epithelium. Interestingly, this is not the case of cholera, which is the archetypal non-inflammatory diarrheal disease. In *V. cholerae* infection no synergy should occur between flagella and cholera toxin, which induces non-inflammatory watery diarrhea. In the case of CDI, it seems more evident that toxins, by eliciting their actions on the cell cytoskeleton and epithelial tight junctions, could promote the interaction between the FliC monomers and the newly exposed TLR5 and the subsequent pro-inflammatory epithelial host response. According to this role of *C. difficile* flagella, analysis of the CDI elicited by R20291 and 630 Δ erm *C. difficile* strains in the *tlr5*^{-/-} KO mice, which do not express TLR5 in the intestinal mucosa, strengthens the role of the TLR5-related flagellar signaling in the pathogenesis of *C. difficile*. Indeed, mice infected by the epidemic R20291 or the non-epidemic 630 Δ erm strains developed only mucosal edema with a very low inflammation score, without clinical signs of CDI. This mucosal edema was probably induced by TcdA/TcdB toxins, which were produced by all the tested strains.

We previously compared the role of R20291 and 630 Δ erm *C. difficile* strains in adhesion and colonization *in vitro* and *in vivo* and showed major behavioral differences between these strains in a germ-free (gnotoxenic) mouse model³⁰. In the current study, we show another important role for *C. difficile* flagella in eliciting an inflammatory host response shared by both strains, but according to the hypervirulent traits of strain R20291, differences persist in the degree of elicited response which may be linked to the level of *in vivo* regulation of toxin synthesis. Nevertheless, in the two strains, toxins alone were not enough to induce the clinical manifestations and the mucosal lesions observed in this CDI mouse model. Considering the high homology in TLR5-recognizing motifs in FliC from the two strains, we can suggest a similar role for flagella from the two strains in eliciting a pro-inflammatory immune response during CDI.

Our work contributes to the knowledge about the virulence factors and pathogenesis of *C. difficile* and highlights other bacterial and host targets in the control of CDI. *C. difficile* flagellin might constitute an interesting vaccine candidate leading to a protective immune response against intestinal pathogens. Interestingly, purified *Salmonella* Typhimurium-derived flagellin protects mice from CDI³². In this context, by stimulating TLR5, flagellin could contribute to the bacterial clearance. On the other hand, the outcome of the CDI could be modulated by targeting the pro-inflammatory signaling pathways so as to reduce the severity of the lesions induced by a strong inflammatory response. Thereby, by deciphering the regulation mechanisms of the TLR5 signaling cascade, it would be possible to target potential effectors of the pro-inflammatory response in order to reduce the effects of a deleterious response.

Altogether, our results strongly suggest the role of the *C. difficile* flagella-TLR5 interaction leading to a pro-inflammatory response of the intestinal mucosa in synergy with TcdA and TcdB. Therefore, the *C. difficile* flagellin would exert its action on the pivotal NF- κ B signaling pathway through exposed TLR5, thus resulting in the development of a deleterious innate immune response which contributes to the pathogenesis of this intestinal pathogen.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth conditions. The *C. difficile* strains used in this study were NAP1/027 R20291 wild-type strain (WT), the *fliC* and the *motB* flagellar mutants³⁰, and the *tcdA* and *tcdB* double mutant (A⁻B⁻)³³, and the respective *fliC*-complemented strain (containing pMTL-SB1 *fliC*-complementation plasmid) as described previously. These mutants were created from *C. difficile* R20291 by insertional inactivation using the ClosTron gene knock-out system. For some experiments *C. difficile* 630 Δ erm strain and its *fliC*³⁰ and A⁻B⁻⁶ isogenic mutants (ClosTron) were also used. *C. difficile* strains were cultured in Brain Heart Infusion (BHI) agar or broth (Oxoid) in an anaerobic chamber (atmosphere of 90% N₂, 5% CO₂ and 5% H₂) at 37 °C. Strains containing the pMTL plasmid were grown in BHI supplemented with 15 μ g/ml thiamphenicol. *Escherichia coli* Top10 and BL21 were cultured in Luria-Bertani agar or broth (Oxoid) supplemented with 50 μ g/ml kanamycin.

***C. difficile* spores for mouse challenge.** *C. difficile* spores were prepared at 37 °C in an anaerobic chamber as previously described by Burns *et al.*³⁴. Briefly, a preculture was grown overnight in BHI supplemented with yeast extract (5 mg/ml, BD) and L-cysteine (0.1%, Merck) (BHIS) and was used to inoculate a starter preculture in BHIS, which was grown to OD_{600nm} 0.2–0.5. Sporulation was then induced in BHIS by inoculation with the starter culture (1 in 100) and incubation for 7 days. Cultures were then washed in sterile water and heated at 70 °C for 25 min to kill vegetative cells and collect spores. Enumeration of spores was performed on BHI agar supplemented with the bile salt taurocholate 0.1% (Sigma-Aldrich).

Animal model. 6–7 week old female C57BL/6 mice were purchased from Charles River (France). 6–7 week old female C57BL/6 *tlr5*^{-/-} knock-out (KO) mice were kindly provided by Thierry Pedron (Philippe Sansonetti laboratory, Pasteur Institute, Paris) and were housed and bred at the animal facility of the Faculty of Pharmacy, Paris-Sud University. Mice were housed in groups of 5 in sterile cages containing irradiated food and autoclaved water. To overcome their resistance to CDI, all mice received an antibiotic pretreatment, as previously described²¹. Mice consumed an antibiotic mixture of kanamycin (0.4 mg/ml), gentamicin (0.035 mg/ml), colistin (850 U/ml), metronidazole (0.215 mg/ml) and vancomycin (0.045 mg/ml) in the drinking water for 3 days. After this treatment, mice were switched to regular autoclaved water. Two days later, all mice received a single dose of clindamycin (250 μ g) by intraperitoneal injection (IP), 24 h prior to challenge. Mice were then infected by oral gavage with 10⁵ spores of *C. difficile* strains. Mice from the control group were pretreated with antibiotic but were orally gavaged with water. Animals were observed daily for signs of disease (diarrhea, hunched posture and ruffled fur). Two days after challenge, mice were euthanized and caecal tissues were collected, washed with PBS and cut in 3 pieces for further analyses (gene expression, histopathology and immunoblotting).

Animal statements. For the mouse studies, animal care and animal experiments were carried out in strict accordance with the Committee for Research and ethical Issues of the International Association for the study of pain (IASP). The animal experimentation protocol was approved by the Animal Welfare Committee of the Paris-Sud University and animal experiments were performed according to the University Paris-Sud guidelines for the husbandry of laboratory animals.

Fecal shedding of *C. difficile* during infection of mice. Unit forming colonies (UFC)/g feces of vegetative cells were obtained after serial dilution of feces in PBS and plating in BHI medium supplemented with 3% horse blood and Oxoid *C. difficile* supplement (250 mg/L D-cycloserine, 8 mg/L Cefoxitin). Plates were incubated in an anaerobic chamber (atmosphere of 90% N₂, 5% CO₂ and 5% H₂) at 37 °C. For spore count, an alcoholic shock was performed and then samples were plated in the same medium supplemented with taurocholate 0.1%.

Quantitative histologic assessment of inflammation in the caecum. The caecal segments assigned for histological studies were fixed in 10% neutral formalin for 18 h, transferred into 70% ethanol and paraffin embedded. 3 µm sections were stained with hematoxylin and eosin and analyzed in a blinded manner using a histopathological scoring scheme. Briefly, caecal inflammation was evaluated with the following criteria measured on 10 different microscopic fields: submucosal edema, degree of lamina propria mononuclear cell infiltration, epithelial damage as previously described³⁵. We added the criteria of loss of goblet cells which was graded as follows: 0: >28; 1: 11–28; 2: 1–10; 3: <1³⁶ (Supplementary Table S1).

SDS-PAGE and Western blot analysis. Caecal tissue was disrupted and homogenized in a buffer containing 186 mM β-mercaptoethanol, 1% bromophenol blue, 10 mM NaF, 25 mM NaPPI, 1 mM Na₃VO₄, using a microtube adapted pellet mixer. After lysis, samples were incubated at 100 °C for 10 min and centrifuged to remove insoluble materials. Proteins were resolved by SDS-PAGE, and gels were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (GE Healthcare). For immunoblotting, membranes were washed with TBS 0.1% Tween 20, blocked in TBS (0.1% Tween 20, 5% milk) and probed overnight with the following specific antibodies: anti-ERK1/2, anti-JNK, anti-IκBα, anti-phosphorylated (anti-p)ERK1/2 and anti-pJNK (Cell Signaling Technology), or anti-actin (Millipore). Blots were then incubated with HRP-linked secondary antibodies (Cell Signaling Technology), followed by chemiluminescence detection with the ECL Plus kit (Millipore) according to the manufacturer's instructions. Chemiluminescence signals were detected with a Fusion FX (Vilber Lourmat) and analyzed densitometrically with Fusion-CAPT software (Vilber Lourmat).

Quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR). Tissue from the caecum was submerged in RNeasy RNA Stabilization Reagent (Qiagen) to protect the RNA. After stabilization for 15 min at room temperature, tissue was lysed using Lysing Matrix D and a FastPrep apparatus (MP Biomedicals). Total RNA was then isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). RNA quantification and quality were assessed by a 2100 Bioanalyzer Agilent. RNA was reverse-transcribed to first strand cDNA using the RT² First Strand Kit (Qiagen). cDNA was prepared from 1 µg RNA using SuperScript[™] III Reverse Transcriptase (Invitrogen) with random primers as described by the manufacturer. qPCR was performed in a 10 µl reaction volume containing 4 ng of cDNA, 5 µl of SSo Advanced[™] SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and 500 nM gene-specific primers. The primers designed with Primer3 software, not to amplify genomic DNA, are listed in Supplementary Table S2. Reactions were run on a CFX96 Real-time system (Bio-Rad) with the following cycling conditions: 30 s polymerase activation at 95 °C and 40 cycles at 95 °C for 5 s and 60 °C for 10 s. An additional step from a start at 65 °C to 95 °C (0.5 °C/0.5 s) was performed to establish a melting curve in order to verify the specificity of the real-time PCR reaction for each primer pair. The results were normalized using the geometric averaging of the GAPDH as reference gene. Normalized relative quantities were calculated using the $\Delta\Delta CT$ method^{37,38}.

Data were collected from three independent experiments and expressed as down- or up-regulation fold. The statistical differences were determined by Student's t-test. P values < 0.05 were considered statistically significant.

Toxicity assay on Vero cell line. Vero kidney epithelial cell line (kindly donated by I. Beau, INSERM UMR-S 984, France) were grown in DMEM with L-glutamine (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂. Cell lines were harvested from the flask with trypsin (0.5 mg/ml)/EDTA (0.2 mg/ml), washed once with medium and seeded into culture plates (TPP, ATGC Biotechnologies) at the desired cell densities and incubated at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂ before experiments. Quantitative detection of toxin in fecal samples was performed by cytotoxicity assay. Briefly, feces from each mouse were collected and diluted in PBS at 1 mg/ml. After thorough mixing, the samples were centrifuged at 12000 g for 5 min, and the supernatants were collected and then sterilized through a 0.22 µm filter. Confluent Vero cells in 96-well plates were exposed to 1:2 to 1:262144 (vol/vol) dilutions of the supernatants in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) containing 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco). The plates were incubated at 37 °C in 5% CO₂ and morphological changes were observed by microscopy after 24 h. The endpoint titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution giving a 50% cytopathic effect (CPE). The assays were performed in triplicate on independent culture supernatants.

Statistical analysis. Results from histologic assessment, fecal shedding, Western blot analysis, and toxicity assay are expressed as means ± sem. Different groups were compared by using Mann and Whitney test performed using StatEL software. P values < 0.05 were considered statistically significant.

References

1. Cloud, J. & Kelly, C. P. Update on Clostridium difficile associated disease. *Curr Opin Gastroenterol* **23**, 4–9 (2007).
2. Cohen, S. H. *et al.* Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol* **31**, 431–455 (2010).
3. Barbut, F., Jones, G. & Eckert, C. Epidemiology and control of Clostridium difficile infections in healthcare settings: an update. *Curr Opin Infect Dis* **24**, 370–376 (2011).
4. Lo Vecchio, A. & Zacur, G. M. Clostridium difficile infection: an update on epidemiology, risk factors, and therapeutic options. *Curr Opin Gastroenterol* **28**, 1–9 (2012).
5. Lyras, D. *et al.* Toxin B is essential for virulence of Clostridium difficile. *Nature* **458**, 1176–1179 (2009).
6. Kuehne, S. A. *et al.* The role of toxin A and toxin B in Clostridium difficile infection. *Nature* **467**, 711–713 (2010).
7. Eveillard, M. *et al.* Identification and characterization of adhesive factors of Clostridium difficile involved in adhesion to human colonic enterocyte-like Caco-2 and mucus-secreting HT29 cells in culture. *Mol Microbiol* **7**, 371–381 (1993).
8. Hennequin, C. *et al.* GroEL (Hsp60) of Clostridium difficile is involved in cell adherence. *Microbiology* **147**, 87–96 (2001).
9. Waligora, A. J. *et al.* Characterization of a cell surface protein of Clostridium difficile with adhesive properties. *Infect Immun* **69**, 2144–2153 (2001).
10. Barketi-Klai, A., Hoys, S., Lambert-Bordes, S., Collignon, A. & Kansau, I. Role of fibronectin-binding protein A in Clostridium difficile intestinal colonization. *J Med Microbiol* **60**, 1155–1161, doi:10.1099/jmm.0.029553-0 (2011).
11. Seddon, S. V. & Borriello, S. P. Proteolytic activity of Clostridium difficile. *J Med Microbiol* **36**, 307–311 (1992).
12. Janoir, C., Pechine, S., Grosdidier, C. & Collignon, A. Cwp84, a surface-associated protein of Clostridium difficile, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins. *J Bacteriol* **189**, 7174–7180 (2007).
13. Calabi, E., Calabi, F., Phillips, A. D. & Fairweather, N. F. Binding of Clostridium difficile surface layer proteins to gastrointestinal tissues. *Infect Immun* **70**, 5770–5778 (2002).
14. Eaton, K. A., Suerbaum, S., Josenhans, C. & Krakowka, S. Colonization of gnotobiotic piglets by Helicobacter pylori deficient in two flagellin genes. *Infect Immun* **64**, 2445–2448 (1996).
15. Tasteyre, A., Barc, M. C., Collignon, A., Boureau, H. & Karjalainen, T. Role of FliC and FliD flagellar proteins of Clostridium difficile in adherence and gut colonization. *Infect Immun* **69**, 7937–7940 (2001).
16. Prince, A. Flagellar activation of epithelial signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**, 548–551 (2006).
17. Abreu, M. T., Fukata, M. & Arditi, M. TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* **174**, 4453–4460 (2005).
18. Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J. & Madara, J. L. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* **167**, 1882–1885 (2001).
19. Yoshino, Y. *et al.* Clostridium difficile flagellin stimulates toll-like receptor 5, and toxin B promotes flagellin-induced chemokine production via TLR5. *Life Sci* **92**, 211–217, doi:10.1016/j.lfs.2012.11.017 (2013).
20. Batah, J. *et al.* Clostridium difficile flagella predominantly activate TLR5-linked NF-kappaB pathway in epithelial cells. *Anaerobe* **38**, 116–124, doi:10.1016/j.anaerobe.2016.01.002 (2016).
21. Chen, X. *et al.* A mouse model of Clostridium difficile-associated disease. *Gastroenterology* **135**, 1984–1992, doi:10.1053/j.gastro.2008.09.002 (2008).
22. Lee, J. Y. *et al.* Effects of transcription factor activator protein-1 on interleukin-8 expression and enteritis in response to Clostridium difficile toxin A. *Journal of molecular medicine* **85**, 1393–1404, doi:10.1007/s00109-007-0237-7 (2007).
23. Ramos, H. C., Rumbo, M. & Sirard, J. C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol* **12**, 509–517, doi:10.1016/j.tim.2004.09.002 (2004).
24. Sierro, F. *et al.* Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 13722–13727 (2001).
25. Andersen-Nissen, E. *et al.* Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 9247–9252, doi:10.1073/pnas.0502040102 (2005).
26. Lee, S. K. *et al.* Helicobacter pylori flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes and infection/Institut Pasteur* **5**, 1345–1356 (2003).
27. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344–362 (2008).
28. Shen, A. Clostridium difficile toxins: mediators of inflammation. *Journal of innate immunity* **4**, 149–158, doi:10.1159/000332946 (2012).
29. Kasendra, M., Barrile, R., Leuzzi, R. & Soriani, M. Clostridium difficile toxins facilitate bacterial colonization by modulating the fence and gate function of colonic epithelium. *J Infect Dis* **209**, 1095–1104, doi:10.1093/infdis/jit617 (2014).
30. Baban, S. T. *et al.* The role of flagella in Clostridium difficile pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain. *PLoS ONE* **8**, e73026, doi:10.1371/journal.pone.0073026 (2013).
31. Barketi-Klai, A. *et al.* The flagellin FliC of Clostridium difficile is responsible for pleiotropic gene regulation during in vivo infection. *PLoS ONE* **9**, e96876, doi:10.1371/journal.pone.0096876 (2014).
32. Jarchum, I., Liu, M., Lipuma, L. & Pamer, E. G. Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute Clostridium difficile colitis. *Infect Immun* **79**, 1498–1503 (2011).
33. Kuehne, S. A. *et al.* Importance of toxin A, toxin B, and CDT in virulence of an epidemic Clostridium difficile strain. *J Infect Dis* **209**, 83–86, doi:10.1093/infdis/jit426 (2014).
34. Burns, D. A., Heeg, D., Cartman, S. T. & Minton, N. P. Reconsidering the sporulation characteristics of hypervirulent Clostridium difficile BI/NAP1/027. *PLoS ONE* **6**, e24894, doi:10.1371/journal.pone.0024894 (2011).
35. Theriot, C. M. *et al.* Cefoperazone-treated mice as an experimental platform to assess differential virulence of Clostridium difficile strains. *Gut Microbes* **2**, 326–334, doi:10.4161/gmic.19142 (2011).
36. Lai, M. A. *et al.* Innate immune detection of flagellin positively and negatively regulates salmonella infection. *PLoS ONE* **8**, e72047, doi:10.1371/journal.pone.0072047 (2013).
37. Hellemans, J., Mortier, G., De Paep, A., Speleman, F. & Vandesompele, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* **8**, R19 (2007).
38. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-(Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).

Acknowledgements

This study was in part supported by the European Union (HEALTH-F3-2008-223585) and by the University Paris-Sud “Attractivité-2012 and 2013” grants. We sincerely thank the technical assistance of Claudine Delomenie (Region Ile de France, IFR141 IPSIT) for qRT-PCR analyses, as well as Valérie Domergue (Region Ile de France, IFR141 IPSIT) for animal facilities. We also thank Sylvie Lambert-Bordes and Sandra Hoys for technical support.

Author Contributions

J.B. and H.K. contributed equally to this work. J.B., H.K., C.D.L., P.T.B.P., S.K., J.C.M. and I.K. conducted experiments and analyzed data; A.C., and C.J.J. advised on experimental designs; C.D.L., J.C.M. and I.K. designed experiments, I.K. wrote the manuscript with contributions from all other authors.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:[10.1038/s41598-017-03621-z](https://doi.org/10.1038/s41598-017-03621-z)

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

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



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

1 Supplementary data to:

2

3 ***Clostridium difficile* flagella induce a pro-inflammatory response in intestinal epithelium of**
4 **mice in cooperation with toxins**

5

6 **Authors**

7 Jameel Batah¹, Hussein Kobeissy¹, Phuong Trang Bui Pham¹, Cécile Denève-Larrazet¹, Sarah
8 Kuehne², Anne Collignon¹, Claire Janoir¹, Jean-Christophe Marvaud¹, Imad Kansau^{1*}

9

10 ¹Faculté de Pharmacie, “Unité Bactéries Pathogènes et Santé” (UBaPS), Université Paris-Sud,
11 Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France; ²School of Dentistry. College
12 of Medical and Dental Sciences. The University of Birmingham, Birmingham B5 7EG, UK.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70

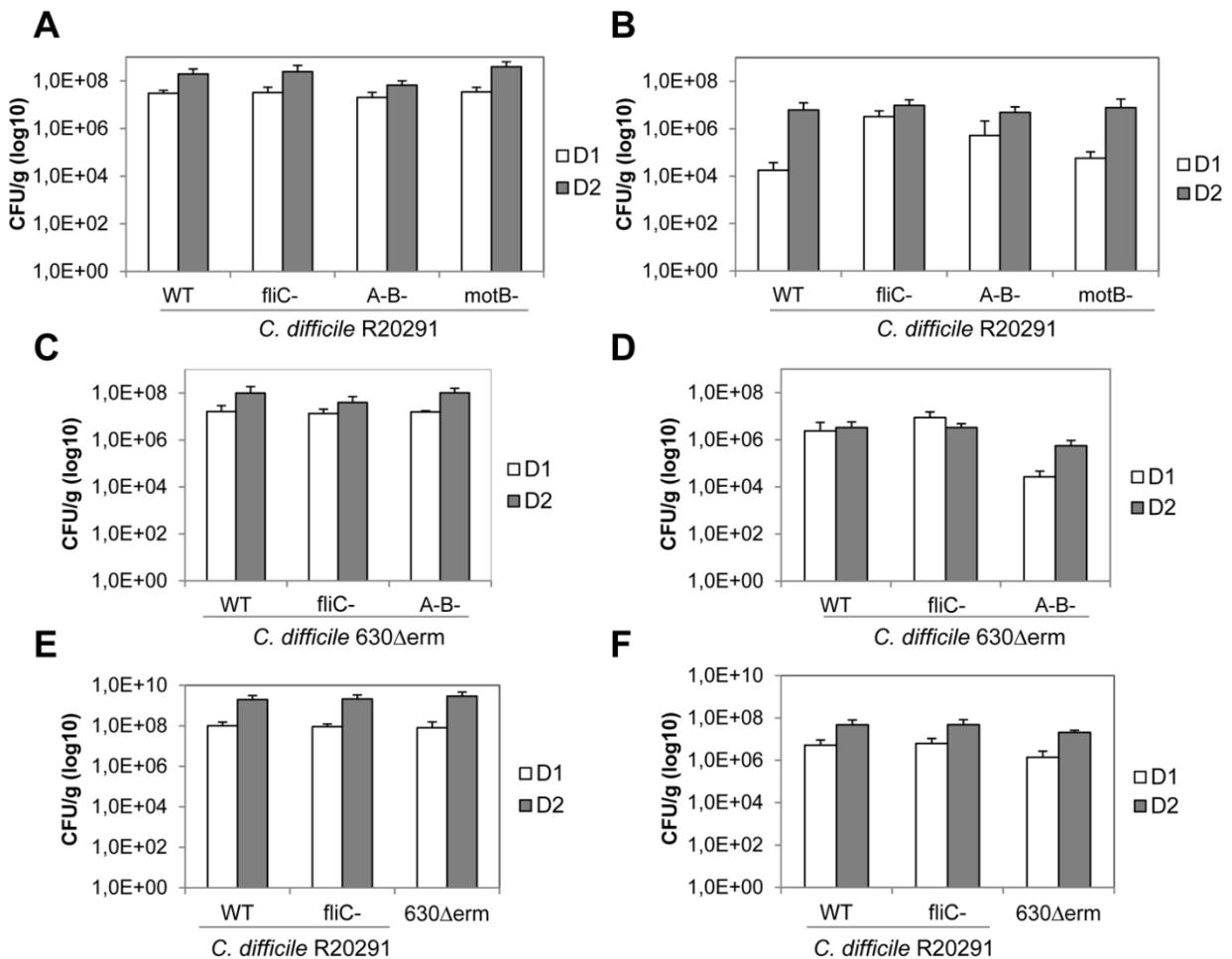


Figure S1. Fecal shedding of *C. difficile* strains during two days post-infection of mice. (A, C, E) vegetative cell count, (B, D, F) spore count. (A, B) R20291 WT strain and its respective *fliC* (Δ FliC), A⁻B⁻, and *motB* (MotB) mutants in conventional mice. (C, D) 630 Δ erm WT strain and its respective *fliC* (Δ FliC) and A⁻B⁻ mutants in conventional mice. (E, F) R20291 WT strain and its respective *fliC* (Δ FliC) mutant, and 630 Δ erm WT in *tlr5*^{-/-} KO mice. (A, C, E) UFC/g feces of vegetative cells were obtained after serial dilution of feces in PBS and plating in BHI medium supplemented with 3% horse blood and antibiotics. For spore count (B, D, F), an alcoholic shock was performed and then samples were plated in the same medium supplemented with taurocholate 0.1%. The results represent the average CFU/g of 10 mice for each group of animals infected with each strain at days 1 (D1) and 2 (D2) post-infection.

71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108

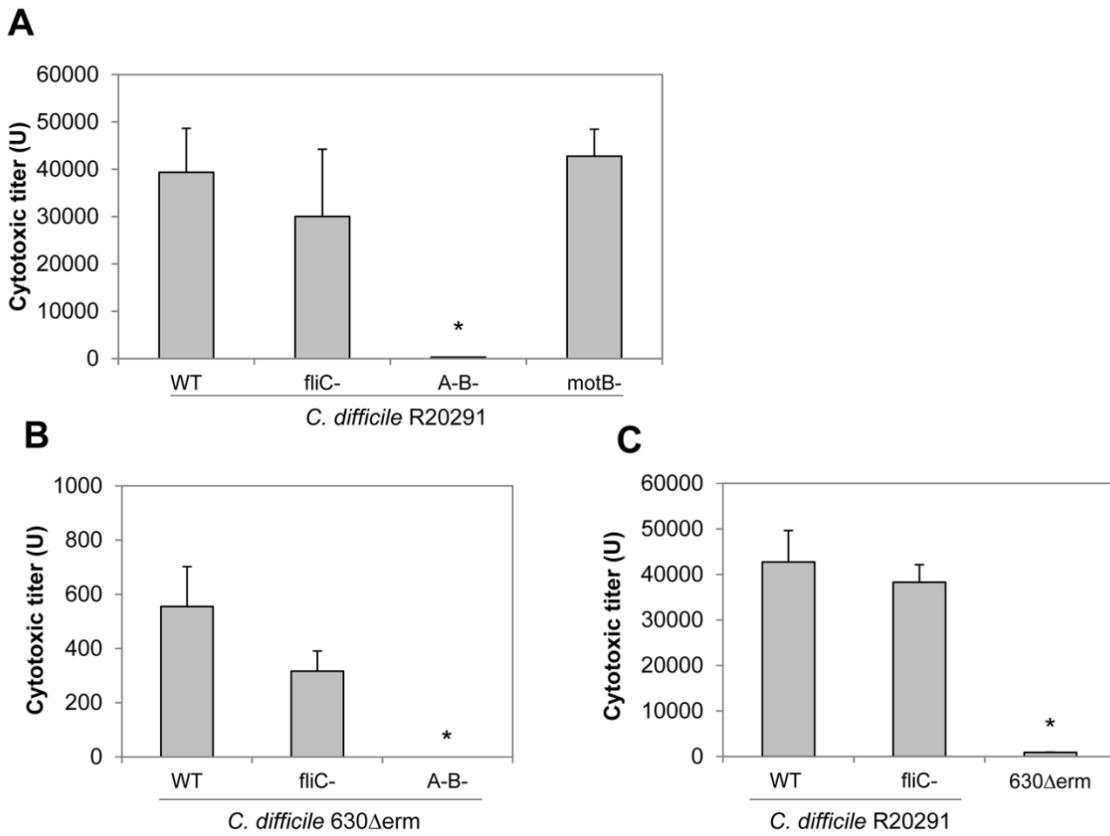


Figure S2. Cytotoxicity activity in feces of *C. difficile* infected mice. (A) R20291 WT strain and its respective *fliC* (Δ FliC), A⁻B⁻, and *motB* (MotB) mutants in conventional mice. (B) 630 Δ *erm* WT strain and its respective *fliC* (Δ FliC), and A⁻B⁻ mutants in conventional mice. (C) R20291 WT strain and its respective *fliC* (Δ FliC) mutant, and 630 Δ *erm* WT in *tlr5*^{-/-} KO mice. Feces from mice were diluted in PBS and centrifuged. Supernatants were filtered (0.22 μ m) and added from 1:2 to 1:262144 (vol/vol) dilutions to confluent Vero cells. Morphological changes were observed by microscopy after 24 h of incubation at 37°C in 5% CO₂. The endpoint titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution giving a 50% cytopathic effect. The assays were performed in triplicate on independent culture supernatants. The bars represent the mean scores for each group of animals (n = 10) and standard deviations. * P < 0.01 compared to WT-infected mice.

109
 110
 111
 112
 113
 114
 115
 116
 117
 118
 119
 120
 121
 122
 123
 124
 125
 126
 127
 128
 129
 130
 131
 132
 133
 134
 135
 136
 137
 138
 139
 140
 141
 142
 143
 144
 145
 146

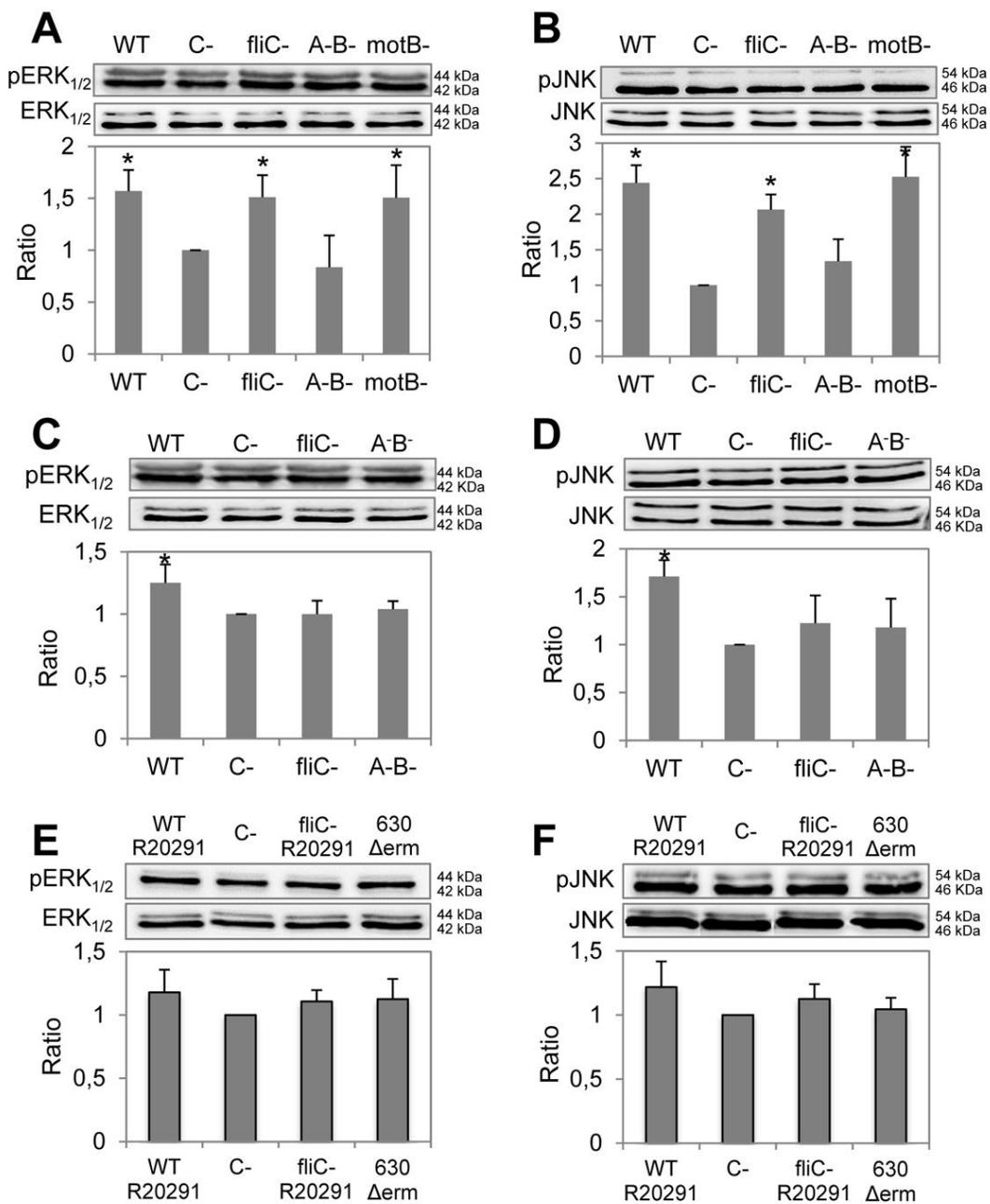


Figure S3. *C. difficile* flagella-induced phosphorylation of ERK and JNK. Caecal lysates were prepared as indicated in Material and Methods section and proteins were resolved by SDS-PAGE. (A, B) R20291 derivative-infected C57BL/6 mice; (C, D) 630Δerm derivative-infected C57BL/6 mice, and (E, F) R20291 derivative- or 630Δerm WT-infected C57BL/6 *tlr5*^{-/-} KO mice. Western blots were then performed using (A, C, E) anti-phosphoERK1/2, ERK1/2, or (B, D, F) anti-phosphoJNK, JNK antibodies. Western blot cropped pictures (full-length blots are in the Supplementary Information file) show the results of a representative experiment. The density of the bands was measured using Fusion software. Ratios pERK/ERK (A, C, E), and pJNK/JNK (B, D, F) were calculated and for the negative control (C-, uninfected mice), this ratio was normalized to 1. The ratio of the other samples was reported to the negative control. Results represent the mean (n = 10) ± standard deviations for each group of animals. * = Statistically significant differences (P < 0.05) compared to the negative control.

147
148
149

Table S1. Inflammation score developed for the *C. difficile* infection mouse model.

1. Submucosal edema	
0	no edema
1	mild edema with minimal (< 2X) multifocal submucosal expansion
2	moderate edema with moderate (2–3X) multifocal submucosal expansion
3	severe edema with severe (> 3X) multifocal submucosal expansion
4	same as score 3 with diffuse submucosal expansion.
2. Cellular infiltration (per 400x high power field)	
0	no inflammation (0-5 cells)
1	minimal multifocal neutrophilic infiltration (6-20 cells)
2	moderate multifocal neutrophilic infiltration (greater submucosal involvement) (21-60 cells)
3	severe multifocal to coalescing neutrophilic infiltration (greater submucosal ± mural involvement (61-100 cells)
4	same as score 3 with abscesses or extensive mural involvement (>100 cells)
3. Epithelial damage	
0	no epithelial changes
1	minimal multifocal superficial epithelial damage. Desquamation (notable shedding of epithelial cells into the lumen)
2	moderate multifocal superficial epithelial damage. Mucosal erosion (loss of epithelium with retention of architecture or gaps of 1-10 cells)
3	severe multifocal epithelial damage (same as above) +/- pseudomembrane (intraluminal neutrophils, sloughed epithelium in a fibrinous matrix). Mucosal ulceration (destruction of lamina propria or gaps of >10 cells)
4	same as score 3 with significant pseudomembrane or epithelial ulceration (focal complete loss of epithelium)
4. Loss of goblet cell (per 400X high power field)	
0	>28
1	11-28
2	1-10
3	<1

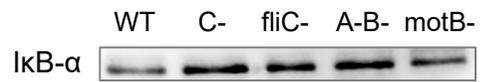
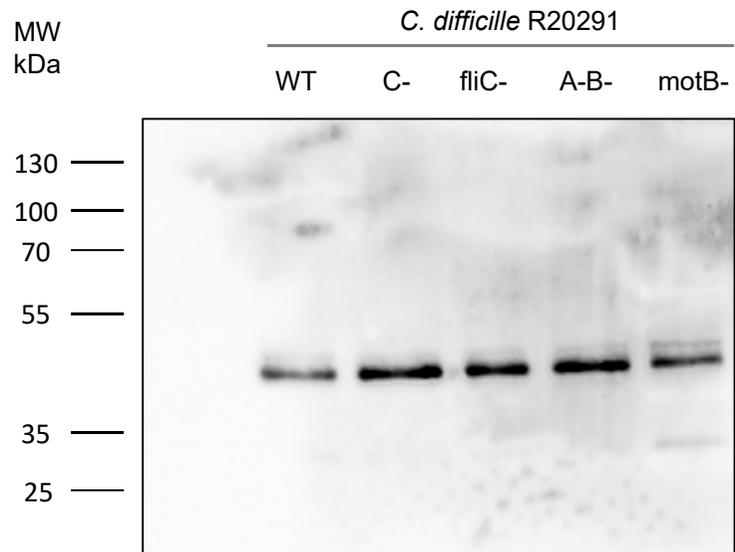
150
151
152

Table S2. Primers used for individual qRT-PCR analysis.

Gene	Primers
mKC (IL-8)	F'-GCTGGGATTCACCTCAAGAA / R'-AGGTGCCATCAGAGCAGTCT
mIL-6	F'-CACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAGA / R'-CTAGGTTTGCCGAGTAGATCT
mIL-1β	F'-ATGGCAACTGTTTCCTGAACTCAACT / R'-CAGGACAGGTATAGATTCTTTCCTTT
m-IL22	F'- GCTCAGCTCCTGTCACATCA/ R'-GTTGAGCACCTGCTTCATCA
mCXCL10	F'-CCCACGTGTTGAGATCATTG / R'-GAGGCTCTCTGCTGTCCATC
mTNF-α	F'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG / R'-ACACATTGGGGGTAGGAACA
mGAPDH	F'- GAACTGGCAGAAGAGGCACT / R'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT

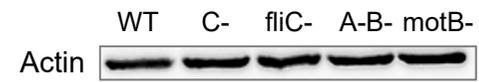
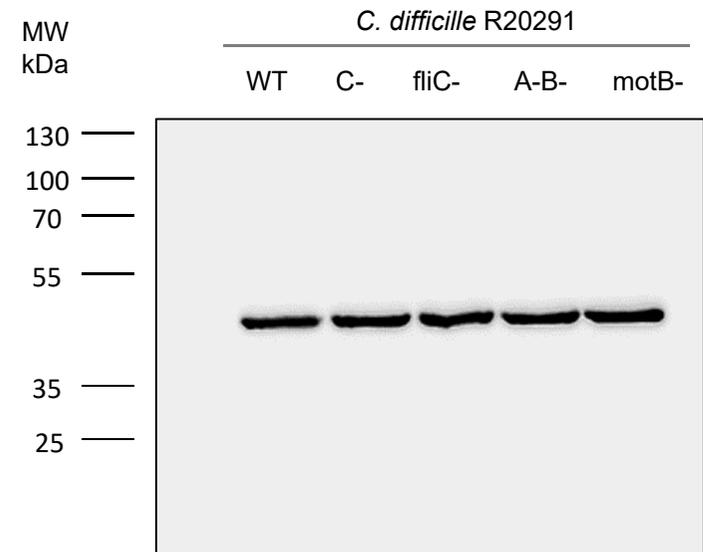
154
155

Anti-I κ B- α Ab



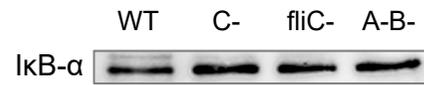
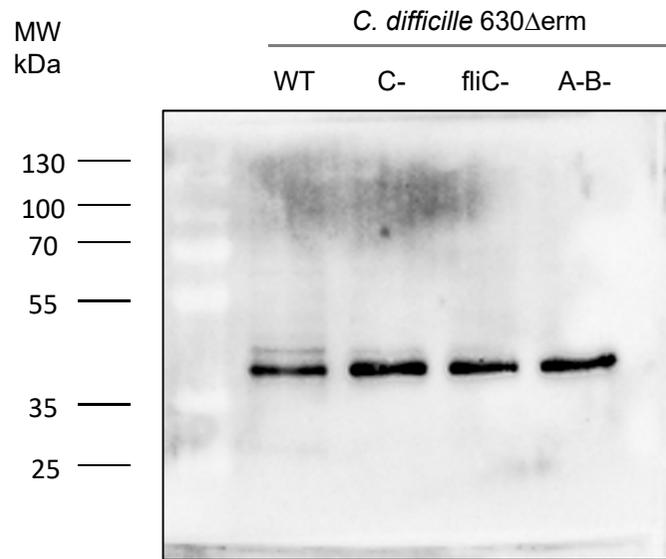
Cropped blot in
Figure 4A

Anti-actin Ab



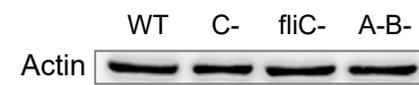
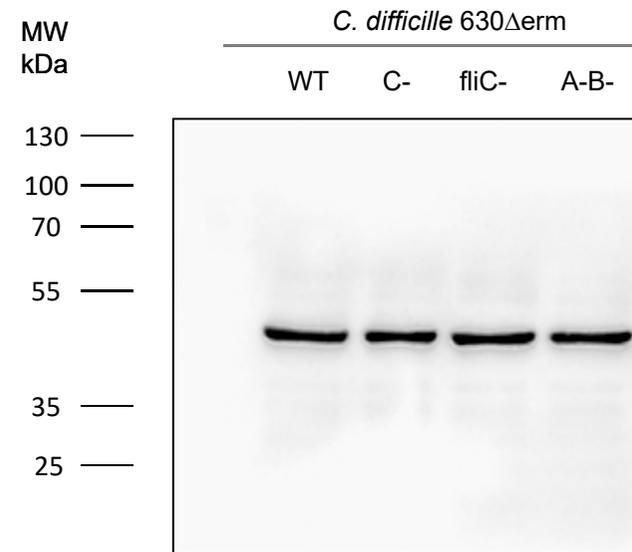
Cropped blot in
Figure 4A

Anti-I κ B- α Ab



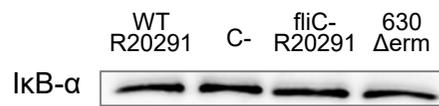
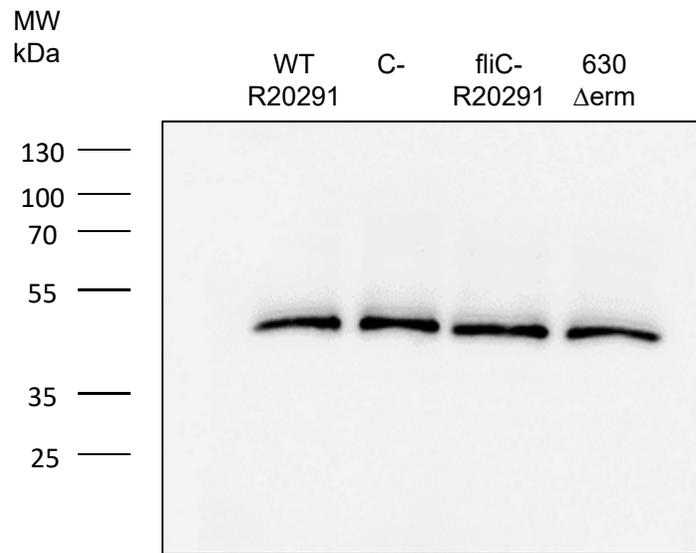
Cropped blot in
Figure 4B

Anti-actin Ab



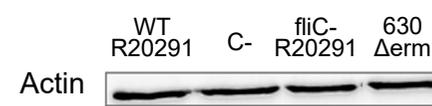
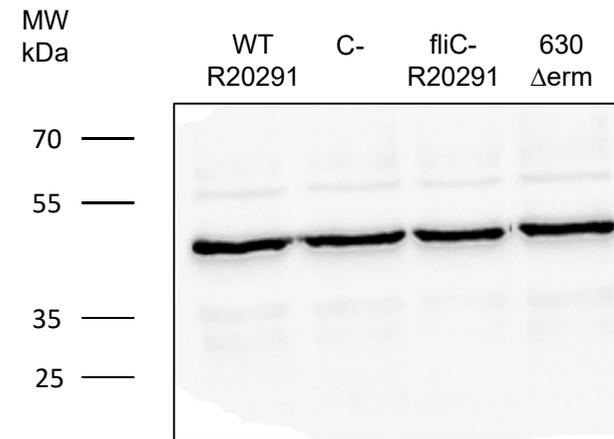
Cropped blot in
Figure 4B

Anti-I κ B- α Ab



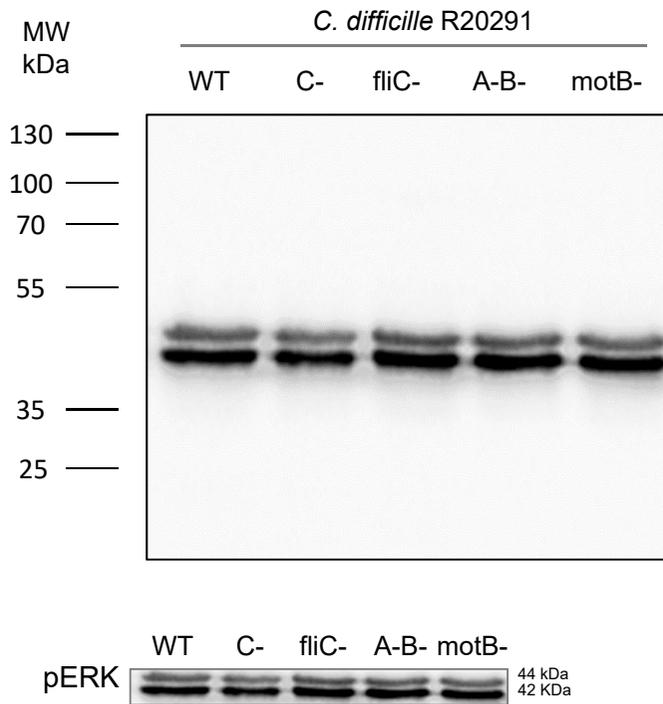
Cropped blot in
Figure 4C

Anti-actin Ab



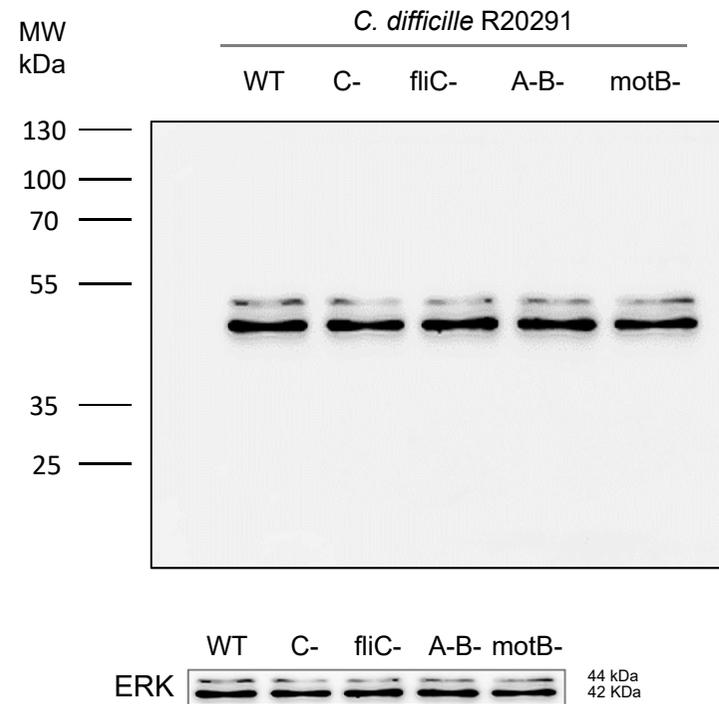
Cropped blot in
Figure 4C

Anti-pERK Ab



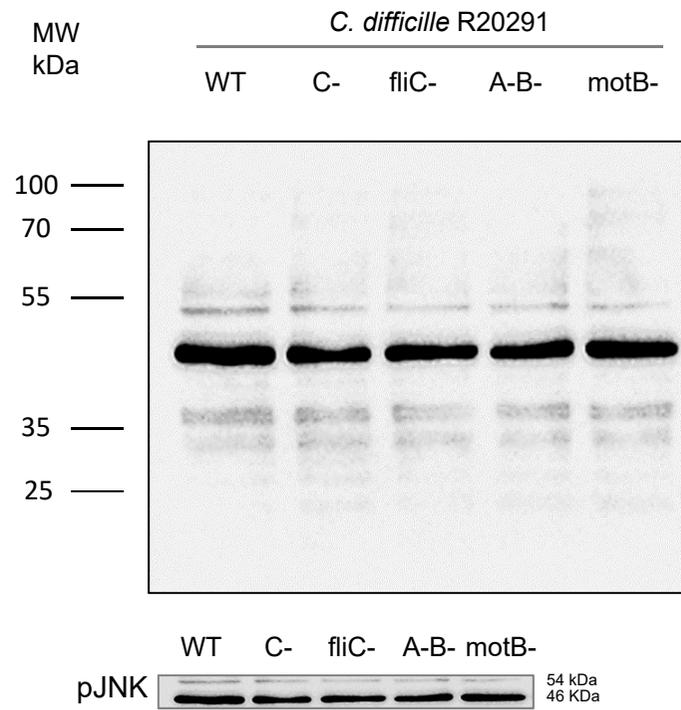
Cropped blot in
Supplementary Figure S3 A

Anti-ERK Ab



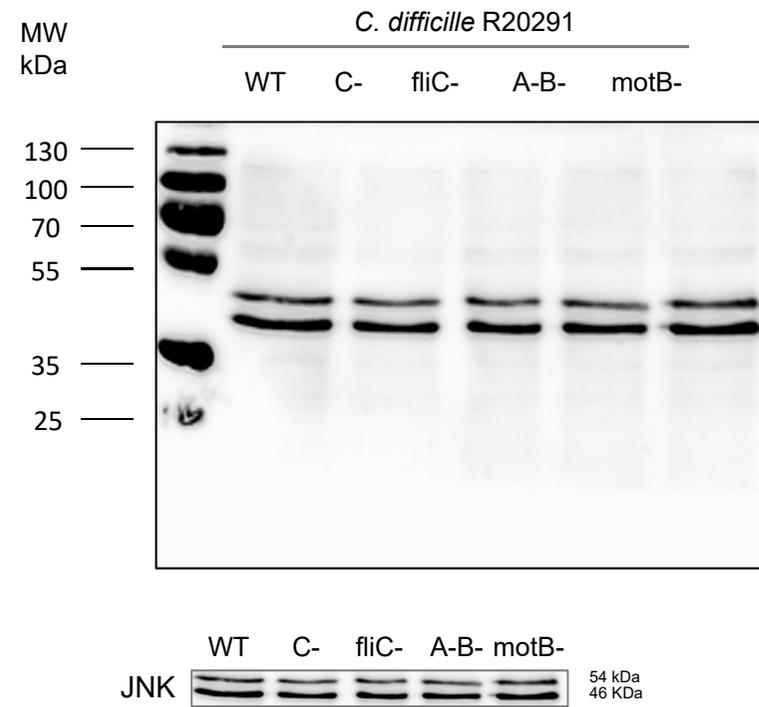
Cropped blot in
Supplementary Figure S3 A

Anti-pJNK Ab



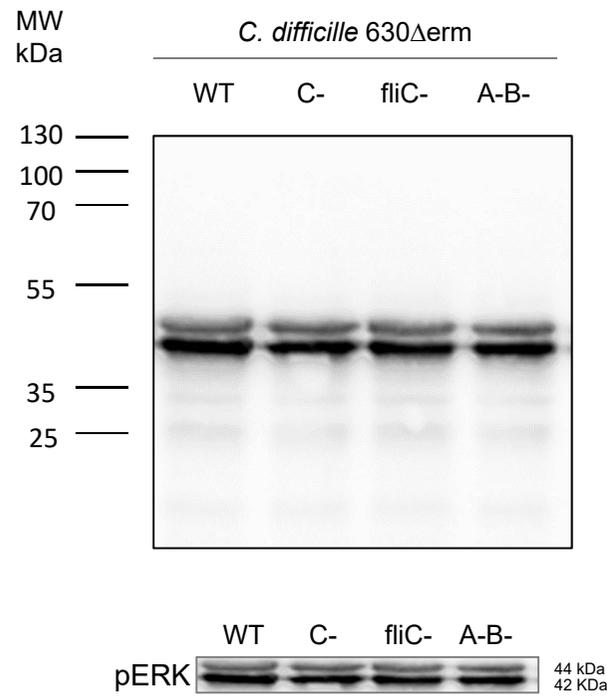
Cropped blot in
Supplementary Figure S3 B

Anti-JNK Ab



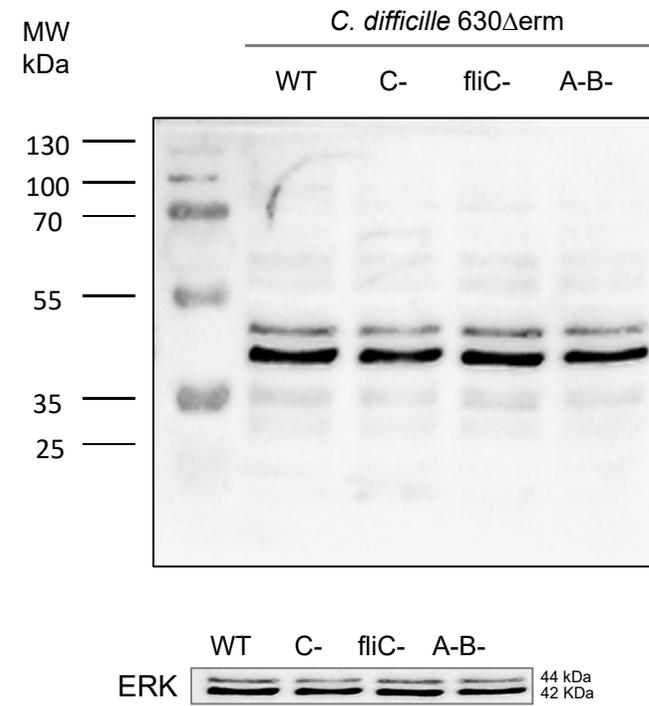
Cropped blot in
Supplementary Figure S3 B

Anti-pERK Ab



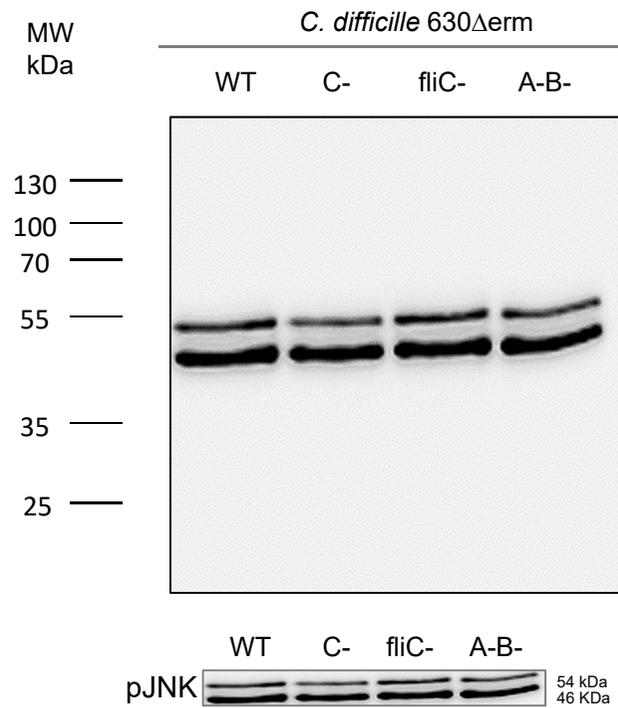
Cropped blot in
Supplementary Figure S3 C

Anti-ERK Ab



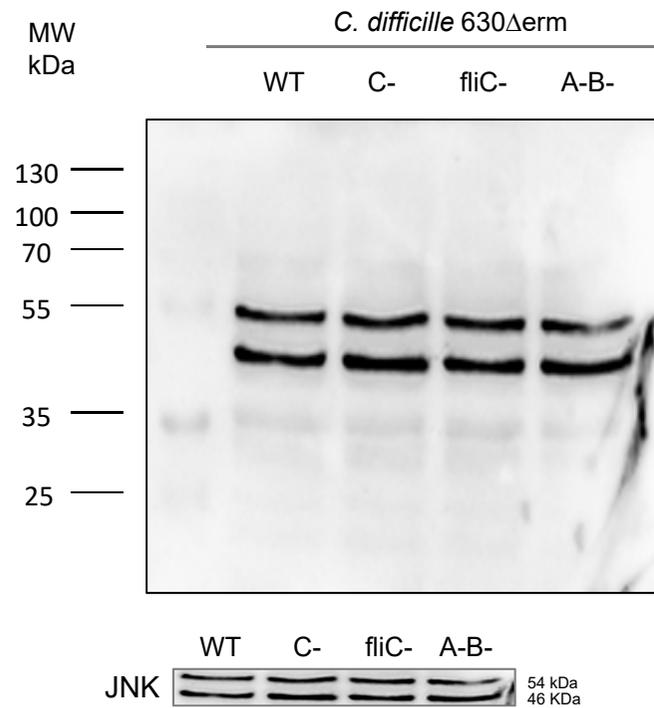
Cropped blot in
Supplementary Figure S3 C

Anti-pJNK Ab



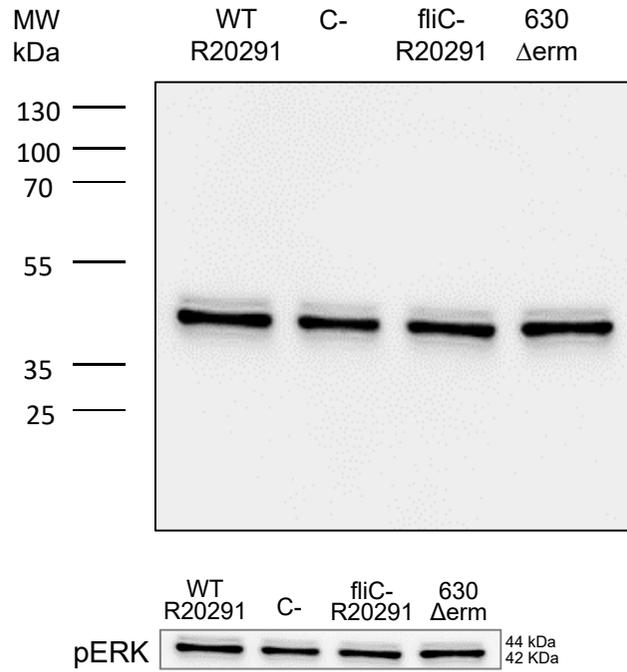
Cropped blot in
Supplementary Figure S3 D

Anti-JNK Ab



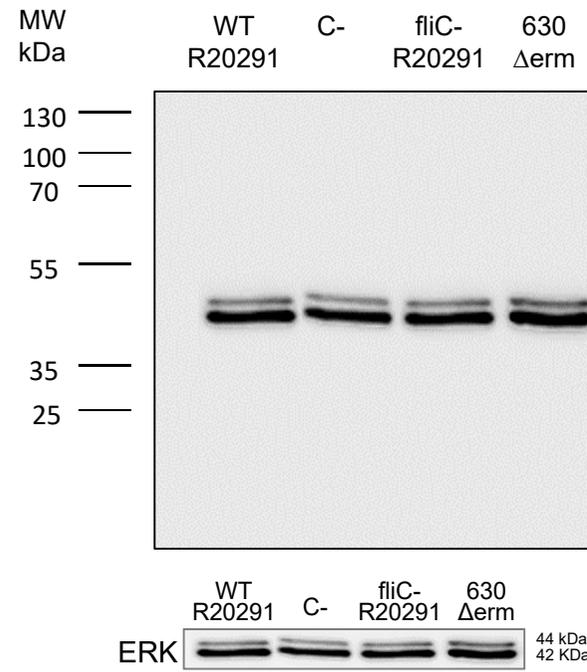
Cropped blot in
Supplementary Figure S3 D

Anti-pERK Ab



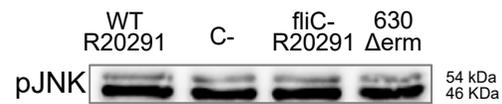
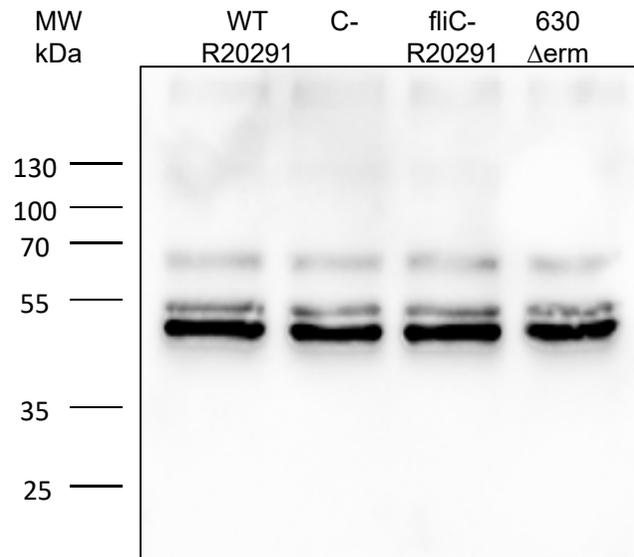
Cropped blot in
Supplementary Figure S3 E

Anti-ERK Ab



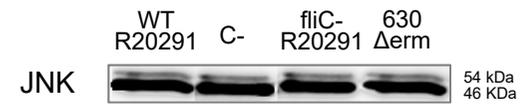
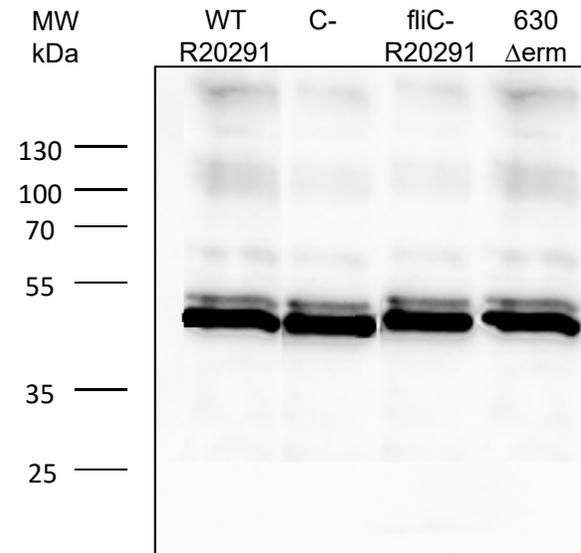
Cropped blot in
Supplementary Figure S3 E

Anti-pJNK Ab



Cropped blot in
Supplementary Figure S3 D

Anti-JNK Ab



Cropped blot in
Supplementary Figure S3 D

PUBLICATION 2

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

III. Publication 2

MicroRNA miR-27a-5p reduces intestinal inflammation induced by *Clostridium difficile* flagella by regulating the NF- κ B signaling pathway

Hussein Kobeissy, Cécile Denève-Larrazet, Jean-Christophe Marvaud, Imad Kansau

Nous avons précédemment rapporté qu'*in vivo*, dans un modèle murin d'ICD, les toxines TcdA et TcdB agissent en coopération avec les flagelles de *C. difficile* pour induire une réponse inflammatoire, suggérant un rôle synergique des toxines et des flagelles dans la réponse inflammatoire intestinale (Voir Publication 1). La sévérité de l'inflammation intestinale est corrélée à la sévérité des manifestations cliniques de l'ICD.

Différents mécanismes de régulation des voies de signalisation des TLR ont été décrits. Parmi ces mécanismes, les microARN, des séquences non codantes d'ARN de 21 à 24 nucléotides, responsables de la régulation post-transcriptionnelle des gènes par leur action spécifique sur les ARNm, jouent un rôle d'immunomodulateurs de la réponse innée par la régulation des voies dépendantes des TLR. L'expression des miARN pourrait être induite par l'activation des TLR pour moduler la réponse inflammatoire par l'inhibition des effecteurs des cascades de signalisation. Ils agissent sur l'expression des cibles effectrices, des facteurs de transcription des voies de l'inflammation et des récepteurs TLR eux-mêmes (Voir chapitre IV. Les microARN).

À ce jour, une seule étude a signalé un lien indirect entre les ICDs et les miARN. Viladomiu et al. ont montré que le miR-146b est régulé positivement dans le côlon de souris infectées par *C. difficile* et cible le co-activateur des récepteurs nucléaires 4 (NCO4), entraînant la suppression du récepteur activé par les proliférateurs des peroxyosomes (PPAR γ). Dans cette étude, la perte de PPAR γ spécifique aux cellules T a augmenté les lésions inflammatoires du côlon après l'ICD et le traitement oral des souris infectées par un antagoniste de PPAR γ réduit la réponse inflammatoire.

Dans la présente étude, nous démontrons qu'un miARN, le miR-27a-5p, est surexprimé *in vitro* et *in vivo* suite à l'infection par *C. difficile* et que son expression est induite par l'activation de la voie NF- κ B suite à l'interaction de flagelline *C. difficile* avec TLR5. Nous avons observé que le miR-27a-5p joue un rôle anti-inflammatoire en inhibant la voie NF- κ B. En outre, l'injection intraveineuse de miR-27a-5p-mimic dans un modèle murin d'ICD réduit la sévérité des manifestations cliniques de l'ICD et l'inflammation intestinale. Au total, nos résultats suggèrent que le miR-27a-5p joue un rôle anti-

inflammatoire dans l'ICD et pourrait être utilisé comme molécule thérapeutique anti-inflammatoire pour contrôler les formes sévères d'infection.

Les résultats que nous avons obtenus sont décrits ci-dessous :

Le miR-27a-5p est surexprimé dans la lignée cellulaire Caco-2 stimulée par la flagelline de *C. difficile* ou par la souche R20291 WT mais pas par son mutant non flagellé

Etant donné que les miARN sont capables de moduler les voies de signalisation en agissant sur l'ARNm, nous avons d'abord recherché des candidats miARN jouant un rôle potentiel dans la régulation de la voie de signalisation pro-inflammatoire NF- κ B induite par l'interaction de la flagelline FlhC et son récepteur spécifique TLR5 (récepteur de la réponse innée) durant l'ICD. Nous avons réalisé une recherche *in silico* à l'aide de 3 algorithmes différents de prédiction de cible pour les miARN, utilisés par les banques de données miRgator, TargetScan et miRWalk. Ces algorithmes en ligne sont basés sur la recherche d'une similarité entre la région 3' UTR de la séquence d'ARNm d'intérêt et la « seed sequence » des miARN présents dans les bases de données spécifiques à chaque banque. Nous nous sommes également basés sur des publications scientifiques indiquant un lien entre les miARN et les différents effecteurs de la signalisation du TLR5 à la suite de la stimulation par les flagelles bactériens. De plus, nous avons utilisé des plaques de qPCR commercialisées par Qiagen et contenant des amorces de miARN déjà décrits comme étant impliqués dans les voies de signalisation pro-inflammatoires connues. Au total, l'expression de cent treize (113) miARN a été étudiée dans des cellules épithéliales intestinales humaines (Caco-2) stimulées par la flagelline FlhC de *C. difficile*. Nous avons suivi la cinétique d'expression de ces miARN sur 12 heures de stimulation. Parmi les miARN testés, le miR-27a-5p a montré une surexpression notamment durant les premières heures d'incubation. Par ailleurs, trois autres miARN ont été surexprimés dans ces cellules : les miR-146a-5p, miR-222-5p et miR-21-3p (résultats non présentés dans l'article préparé) (Figure 34). La surexpression du miR-27a-5p et des trois autres miARN a été confirmée lorsque les cellules ont été infectées par la souche R20291 de *C. difficile* à 2 h d'incubation, alors qu'aucune surexpression n'a été observée lorsque les cellules ont été infectées par le mutant non flagellé.

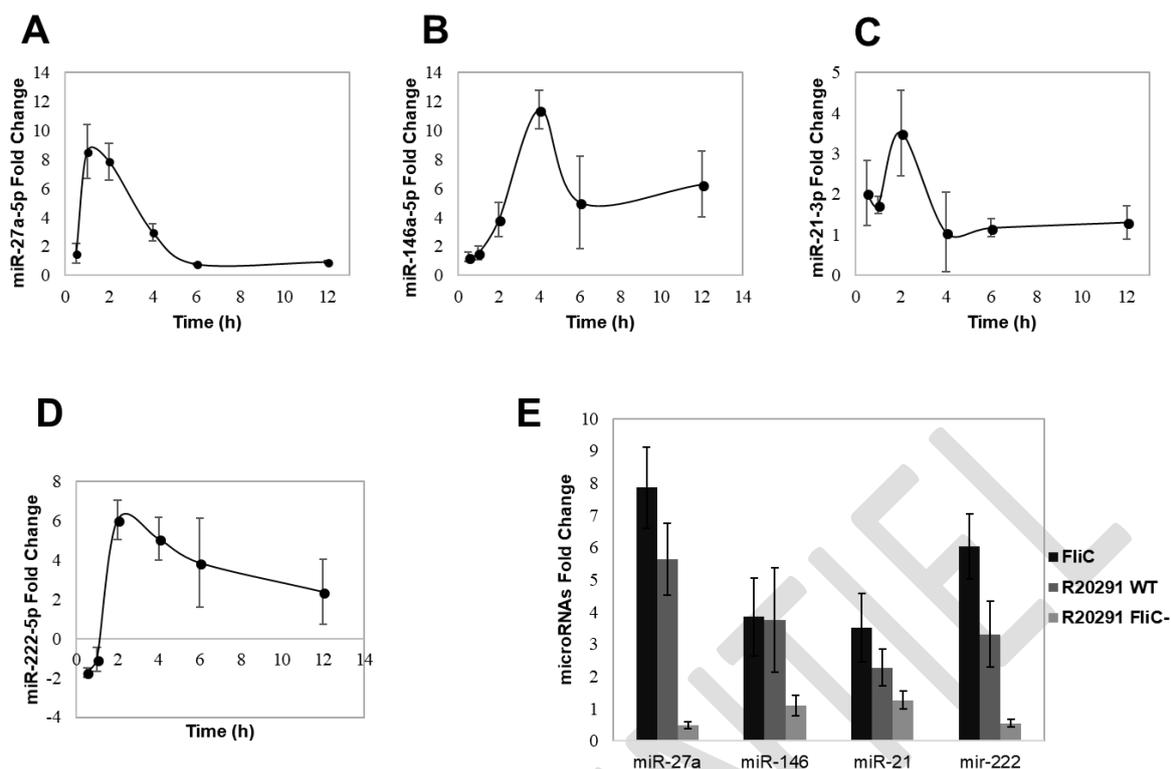


Figure 34. Cinétique de surexpression des miARN par les cellules Caco-2 incubées avec la flagelline FliC ou *C. difficile*. Expression des miR-27a-5p (A), miR-146a-5p (B), miR-21-3p (C) et miR-222-5p (D) par les cellules Caco-2 incubées avec FliC. (E) Les cellules ont été incubées avec FliC ou infectées par la souche sauvage R20291 (WT) ou son mutant non flagellé (FliC-) pendant 2 h. L'expression des miARN a été mesurée par qRT-PCR avec les oligonucléotides du Tableau S1 (article en préparation). Les barres correspondent aux écart-types des moyennes d'au moins 3 expériences indépendantes.

L'expression du miR-27a-5p est fortement induite par l'activation de la voie de signalisation pro-inflammatoire de NF- κ B induite par *C. difficile* et par sa flagelline FliC.

Afin d'analyser l'impact de l'inhibition des voies de signalisation NF- κ B et MAPKs (ERK1/2, p28 et JNK) sur l'expression des miR-27a-5p, miR-146a-5p, miR-222-5p et miR-21-3p, des effecteurs spécifiques de ces voies de signalisation ont été inhibées chimiquement par des inhibiteurs spécifiques d'IKK α (voie de NF- κ B) et des MAPKs ERK1/2, p38 et JNK, pendant 1 h avant la stimulation des cellules par FliC ou par les bactéries. Après 1 h d'incubation des cellules avec FliC ou la souche R20291, l'expression des quatre miARN analysés a été pratiquement abolie (Figure 35). Cependant, l'inhibition la plus importante (environ 40 fois) de l'expression du miR-27a-5p a été obtenue par l'inhibiteur d'IKK α (BMS 345541), suggérant un rôle important de ce miARN dans la régulation de la voie de signalisation pro-inflammatoire NF- κ B induite par *C. difficile* et sa flagelline.

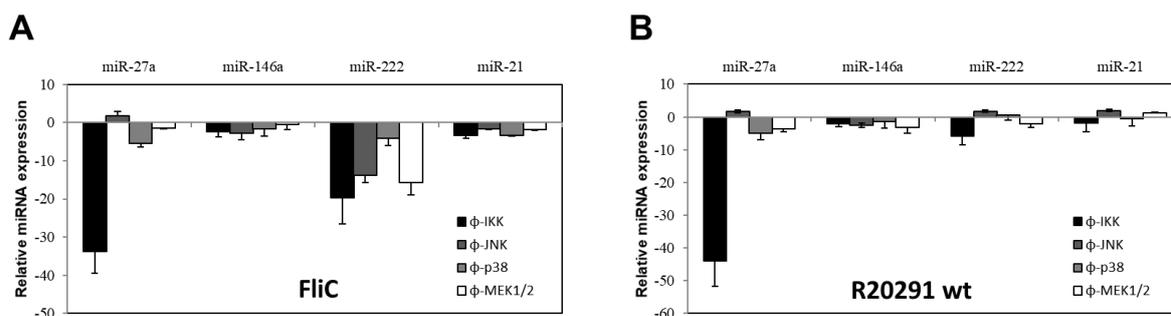


Figure 35. Inhibition de la surexpression des miARN par des inhibiteurs chimiques spécifiques de NF- κ B et des MAPKs dans les cellules Caco-2 incubées avec la flagelline FliC ou la souche R20291 de *C. difficile*. Les voies NF- κ B et MAPKs ont été inhibées 1 h avant la stimulation ou l'infection des cellules, par 20 μ M BMS 345541 (inhibiteur IKK α), 20 μ M U0126 (inhibiteur MEK1/2), 20 μ M PD98059 (inhibiteur MEK1), 20 μ M SP600125 (inhibiteur JNK) ou 3 μ M SB203580 (inhibiteur p38). L'expression des miR-27a-5p, miR-146a-5p, miR-21-3p et miR-222-5p a été analysée après incubation des cellules avec FliC (A) ou infection par la souche sauvage R20291 (WT) (B) pendant 2 h. L'expression des miARN a été mesurée par qRT-PCR. Les barres correspondent aux écart-types des moyennes d'au moins 3 expériences indépendantes.

Un miR-27a-5p-mimic inhibe la voie de signalisation pro-inflammatoire NF- κ B induite par *C. difficile* et sa flagelline FliC *in vitro*.

Les résultats précédant suggèrent que le miR-27a-5p, dont l'expression est induite par *C. difficile* et sa flagelline FliC via l'activation de NF- κ B, joue un rôle dans la régulation de cette voie pro-inflammatoire. Nous avons cherché à déterminer si ce miARN a un rôle activateur (pro-inflammatoire) ou inhibiteur (anti-inflammatoire) de la voie NF- κ B à l'aide de molécules (oligonucléotides) mimant son activité (miR-27a-5p-mimic) ou antagonisant son activité (miR-27a-5p-inhibitor ou anti-miR-27a-5p).

Après transfection des cellules Caco-2 par le miR-27a-5p-mimic ou le miR-27a-5p-inhibitor, ainsi que des oligonucléotides mimic et inhibitor contrôles, l'expression du miR-27a-5p a été mesurée après lyse cellulaire. L'anti-miR-27a-5p réduit significativement l'expression de ce miARN dans les cellules stimulées par FliC (1,5 fois), alors que le miR-27a-5p-mimic entraîne sa forte surexpression (35 fois). L'effet de la transfection des cellules par ces deux molécules a été évalué par la mesure de la dégradation de l'effecteur I κ B- α signant l'activation de la voie NF- κ B, de l'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-8, ainsi que de la production d'IL-8 dans le surnageant de culture cellulaire.

L'anti-miR-27a-5p induit une forte dégradation d'I κ B- α (0,35 fois), une expression accrue des ARNm des cytokines TNF α (200 fois) et IL-8 et (350 fois), ainsi qu'une augmentation de la synthèse d'IL-8 dans le surnageant de culture (27 fois), suggérant que le miR-27a-5p joue un rôle inhibiteur de la voie

NF- κ B, et donc un rôle anti-inflammatoire dans la cascade de signalisation induite par l'interaction FliC-TLR5. Dans le sens de ces observations, la transfection des cellules par le miR-27a mimic induit une réponse cellulaire anti-inflammatoire, caractérisée par l'absence de dégradation d'I κ B- α et donc de l'activation de NF- κ B, ainsi qu'une forte inhibition de l'expression des ARNm des cytokines TNF α (59 fois) et IL-8 (56 fois), et une absence de synthèse d'IL-8 dans le surnageant cellulaire. L'ensemble de ces observations montre que le miR-27a-5p pourrait jouer un rôle inhibiteur de la voie pro-inflammatoire NF- κ B à la suite de l'activation de cette voie par l'interaction flagelline-TLR5. Ce miARN interviendrait ainsi dans une boucle de rétrocontrôle de la cascade de signalisation TLR5-NF- κ B.

Le miR-27a-5p est surexprimé *in vivo* dans le caecum des souris infectées par *C. difficile*.

Afin de confirmer les observations réalisées *in vitro* quant au rôle potentiel du miR-27a-5p dans la régulation de l'inflammation induite par *C. difficile* et son flagelle, nous avons analysé l'expression de ce miR-27a-5p dans l'intestin (caecum) lors de l'infection sur le modèle murin d'ICD. Il faut noter que le miR-27a-5p est conservée entre la souris et l'homme et possède la même séquence.

Deux groupes de souris C57BL/6 (microbiote conventionnel) femelles âgées de 5 à 6 semaines (n = 10) et un groupe de souris C57BL/6 KO *tlr5*^{-/-} (n'exprimant pas le TLR5, n = 10) ont été constitués. Après le traitement antibiotique des animaux durant les 6 jours précédant l'infection permettant de créer une dysbiose (Voir Material & Methods, article en préparation), un groupe de souris a été infecté par gavage orogastrique avec la souche sauvage R20291 de *C. difficile* (WT) et un deuxième groupe par le mutant isogénique dépourvu de flagelles (FliC-). Le groupe de souris KO *tlr5*^{-/-} a également été infecté par la souche WT. Un groupe de souris non infectées a servi comme contrôle afin d'établir les rapports d'expression relative du miARN pour chaque groupe. L'analyse de l'expression du miR-27a-5p dans le caecum des animaux a montré une plus forte expression de ce miARN dans le caecum des souris infectées par la souche WT, par rapport à l'expression observée chez les souris infectées par le mutant non flagellé (FliC-) et celle des souris KO *tlr5*^{-/-} infectées par la souche WT. Ces résultats indiquent que le flagelle de *C. difficile*, par son interaction avec TLR5, joue un rôle dans l'expression accrue du miR-27-a-5p dans le caecum des souris, suggérant qu'*in vivo*, l'activation de NF- κ B à la suite de l'interaction flagelle-TLR5 est corrélée à l'expression du miR-27a-5p. Par ailleurs, l'analyse de l'expression de l'ARNm du gène de la cytokine KC chez la souris, équivalent de l'IL-8 humaine, révèle une parfaite corrélation avec l'expression accrue du miR-27a-5p.

Un mimique du miR-27a-5p réduit la sévérité de l'inflammation *in vivo* dans le modèle murin d'ICD.

Compte tenu du phénotype anti-inflammatoire observé dans les cellules Caco-2 transfectées par le miR-27a-5p-mimic, nous avons analysé l'effet d'un *miARN-mimic* par voie intraveineuse (IV) sur le modèle murin d'ICD. Différents groupes de souris C57BL/6 (microbiote conventionnel) femelles âgées de 4 à 5 semaines ont été testés (Tableau 2). Après le traitement antibiotique induisant la dysbiose, un groupe d'animaux non infectés (contrôle négatif non infecté) a été traité ou non par la suspension miR-27a-5p mimic / *in vivo*-jetPEI® (véhicule permettant la protection du *miARN-mimic* pour administration par voie IV) à raison de 3 doses de 50 µg (soit 2,5 mg/kg), au moment de l'infection, 8 h et 24 h après l'infection, par voie IV (150 µL injectés en rétro-orbital) (Tableau 2). Un deuxième groupe d'animaux a été infecté par la souche sauvage R20291 de *C. difficile* (n = 10) ; un sous-groupe de 6 souris infectées a été traité par un oligonucléotide non fonctionnel (contrôle mock) ; un troisième groupe a été également infecté par la souche de *C. difficile* mais traité par la suspension miR-27a-5p mimic / *in vivo*-jetPEI® comme pour le premier groupe.

Tableau 2. Groupes de souris utilisés dans l'étude *in vivo* de l'effet du miR-27a-mimic-5p sur le modèle murin d'ICD.

Groupe de souris	Nb	Manifestations cliniques *	Score histologique de l'inflammation	Mortalité
Souris contrôles non-infectées				
Non infectées - Non traitées	5	– (100 %)	0	0
Non infectées + miR-27a-5p-mimic	10	– (100 %)	0	0
Souris contrôles infectées par <i>C. difficile</i>				
Infectées	10	+ (100 %)	7 (5-9)	2
Infectées + contrôle mock	6	+ (100 %)	**	1
Souris infectées + miR-27a-5p-mimic				
	16	– (70 %)	3 (0-4)	0
		+ (30 %)	7 (5-9)	0

* Diarrhée, Poils hérissés et activité réduite ; ** En cours ; – Absence et + présence de manifestations cliniques.

À la suite de l'infection, comme attendu dans ce modèle d'ICD, toutes les souris infectées (100 %) et non traitées par le miR-27a-mimic y compris le sous-groupe traité par le contrôle mock, ont développé des signes cliniques d'ICD : diarrhée, poil hérissé et diminution de l'activité à J1 et J2 post-

infection avec 19 % (3/16 souris) de mortalité à J2 de l'infection. En revanche, seuls 5 animaux sur 16 (30 %) du groupe infecté et traité par le miR-27a-mimic ont développé une diarrhée, et ce à J2 post-infection sans mortalité observée (Tableau 2). Il est à noter que le taux de colonisation intestinal des animaux infectés, évalué par le dénombrement bactérien dans le contenu caecal (unités formant colonies – UFC/g) à J2 post-infection est équivalent entre les groupes de souris infectées (WT + oligonucléotide contrôle négatif et WT + miR-27a-mimic), excluant la possibilité que la différence dans les manifestations cliniques entre ces deux groupes soit le résultat d'une faible colonisation intestinale des souris.

A J2 post-infection, l'analyse anatomo-pathologique du caecum des animaux infectés par la souche sauvage et traités ou non par le contrôle mock, a montré un aspect hyperhémique inflammatoire avec des zones hémorragiques et un contenu caecal muqueux, associé à la présence très faible de matières fécales par rapport au caecum normal des souris non infectées. L'aspect inflammatoire du caecum a été largement atténué dans le groupe des souris infectées et traités par le miR-27a-mimic (Fig. 6E, publication en préparation). En ce qui concerne l'étude histologique des coupes de caeca, comme attendu, un œdème important de la muqueuse, avec un infiltrat inflammatoire, une érosion épithéliale et une perte de cellules calciformes sont retrouvés dans le caecum des souris infectées par la souche sauvage et non traitées par le miR-27a-mimic, avec un score d'inflammation allant de 5 à 9, comparé au score 0 observé pour le caecum des souris non infectées. En revanche, dans le groupe d'animaux infectés et traités par le miR-27a-mimic, 11 souris sur 16 ont présenté un caecum indemne ou avec peu de signes d'inflammation et un contenu caecal normal et sans mucus. Le score histologique d'inflammation était inférieur à 5 pour ces animaux qui présentaient principalement un infiltrat cellulaire et un œdème léger à modéré. Les souris du groupe infecté et traité par le miR-27a-mimic ayant présenté une diarrhée à J2 post-infection ont obtenu un score d'inflammation élevé et comparable aux souris infectées et non traitées, ce qui ramène le taux d'efficacité du miR-27a-mimic à 70 % sur ce modèle murin d'infection (Tableau 2).

L'analyse de l'activation de la voie NF- κ B dans le tissu caecal à J2 post-infection a révélé une forte dégradation d'I κ B- α dans le caecum des souris infectées et non traitées par le miR-27a-mimic, comparé aux souris non infectées, ce qui correspond, tout comme pour les manifestations cliniques, aux observations habituelles sur ce modèle d'ICD. En revanche, aucune activation d'I κ B- α n'a été détectée dans le caecum des souris infectées et traitées par le miR-27a-mimic. De même, l'expression caecale des cytokines IL-8, IL-6 et TNF α a été fortement réduite chez les souris infectées et traitées par le miR-27a-mimic par rapport aux souris infectées et non traitées par ce miARN, mais par le mock contrôle ce qui renforce les observations précédentes quant à la réduction par le miR-

27a-5p-mimic des manifestations cliniques et des phénomènes inflammatoires intestinaux associés à l'infection par la bactérie dans ce modèle murin.

Conclusion

La stimulation de récepteurs de la surface épithéliale muqueuse et l'induction de voies de signalisation par des produits de bactéries pathogènes a pour conséquence une réponse de l'hôte dont la régulation est essentielle pour maintenir son homéostasie tout en éliminant le pathogène. Dans le cas particulier de l'infection à *C. difficile*, nous avons montré que l'action synergique des toxines et des flagelles induit une forte réponse inflammatoire innée responsable de lésions muqueuses. La modulation spécifique de cette réponse par les miARN pourrait impacter la présentation clinique ainsi que le pronostic des ICD.

Nous avons identifié le miR-27a-5p comme étant impliqué dans la régulation de la réponse pro-inflammatoire liée à l'activation de la voie de signalisation NF- κ B activée par l'interaction flagelles-TLR5 au cours de l'infection intestinale par *C. difficile*. Nous avons ensuite caractérisé ce miARN et nos résultats suggèrent que l'activation induite par les flagelles de *C. difficile* provoque une surexpression de ce miARN, lequel à son tour pourrait inhiber la voie de signalisation pro-inflammatoire NF- κ B. Les conséquences d'une telle régulation pourraient avoir une incidence dans le degré de la réponse inflammatoire et donc dans des manifestations cliniques observées durant l'infection intestinale par *C. difficile*. Nous avons ensuite évalué l'effet d'un miR-27a-5p-mimic spécifique ciblant cette voie de signalisation pro-inflammatoire TLR5-NF- κ B induite par *C. difficile*, dans un modèle murin d'ICD dans le but de réduire la réponse délétère de l'hôte responsable des lésions tissulaires et des manifestations cliniques sévères. La preuve du concept a été établie : les résultats montrent une efficacité de 70 % de ce miARN-mimic dans la diminution de la réponse inflammatoire intestinale chez la souris. Cet aspect de la régulation de la réponse inflammatoire induite par *C. difficile* apporte des éléments sur la possibilité d'une approche thérapeutique innovante à considérer dans le contrôle et la prise en charge des formes sévères d'infection par la bactérie voire dans le contrôle d'autres processus pathologiques inflammatoires de l'intestin.

1 **Title**

2 **MicroRNA miR-27a-5p reduces intestinal inflammation induced by *Clostridium difficile* flagella by**
3 **regulating the NF- κ B signaling pathway**

4 **Authors**

5 Hussein Kobeissy¹, Cécile Denève-Larrazet¹, Jean-Christophe Marvaud¹, Imad Kansau^{1*}

6 ¹Faculté de Pharmacie, "Unité Bactéries Pathogènes et Santé" (UBaPS), Université Paris-Sud,

7 Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

8

9 *** Corresponding author: Imad Kansau** (Email: imad.kansau@u-psud.fr)

10

CONFIDENTIEL

11 **Abstract**

12 *Clostridium difficile*, a Gram positive, anaerobic bacterium, has become the main cause of intestinal
13 nosocomial post-antibiotic infections in the Western world. A watery diarrhea and severe
14 inflammatory response can be developed during *C. difficile* infection. We recently reported, both *in*
15 *vitro* and *in vivo* mouse models, that *C. difficile* flagellin FliC, the major structural protein of the
16 flagella, by activating the TLR5, induces the activation of the NF- κ B cell signaling, leading to the
17 secretion of pro-inflammatory cytokines. However, the regulatory mechanisms of this FliC-induced
18 inflammatory response are not clear. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs acting as post-
19 transcriptional regulators of gene expression, and their role in *C. difficile* infection remains to be
20 explored. In this work, we analyzed the expression of a panel of miRNAs which are known to be
21 involved in the cell TLR5- and NF- κ B-signaling, in the human Caco-2 intestinal epithelial cells. Overall
22 the tested miRNAs, miR-27a-5p was overexpressed in a time-dependent manner in FliC-stimulated
23 Caco-2 cells. Moreover, this overexpression was similarly observed when cells were infected with the
24 epidemic *C. difficile* R20291 strain but not by its unflagellated mutant, suggesting the role of the
25 flagellin in miR-27a-5p overexpression. Specific chemical inhibition of the NF- κ B signaling pathway
26 strongly inhibited the overexpression of this miRNA. Knocking down miR-27a-5p increased the
27 activation of NF- κ B and the production of pro-inflammatory cytokines in FliC stimulated Caco-2 cells,
28 while its overexpression decreased it. Furthermore, we showed in a mouse model of *C. difficile*
29 infection that miR-27a-5p is also overexpressed in mice caeca and its expression was correlated with
30 intestinal KC expression level. Systemic treatment of infected mice with miR-27a-5p-mimic
31 significantly decreased disease activity and intestinal inflammatory response. Finally, *in silico*
32 prediction and 3'UTR reporter assay suggest that the NF- κ B subunit RELA could represent a target of
33 miR-27a-5p. Taken together, these results suggest that the regulation of the inflammatory response
34 by miR-27a-5p-mimic could bring new elements to consider in the therapeutic strategies for severe
35 forms of CDI control.

36

37

38

39

40

41

42 Introduction

43 *Clostridium difficile* is the main enteropathogenic bacterium responsible of post-antibiotic infections
44 in industrialized countries (1,2). Antibiotic exposure, hospitalization and advanced age are the main
45 risk factors for *C. difficile* infection (CDI) (1). CDI can range from mild diarrhea to severe
46 pseudomembranous colitis that is life-threatening. Increasing in the incidence and severity of ICDs in
47 recent years coincides with the emergence of epidemic clones, particularly strains of ribotype 027.
48 This increase has been accompanied by an increase from 27 to 93 % in the cost of care (3–5). It is
49 estimated that the annual economic burden of ICDs in the United States health system is estimated
50 at nearly \$ 4.8 billion annually in excess costs in acute care facilities (3). In Europe, the costs of
51 treating CDIs estimated by the European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) are nearly
52 \$ 4.4 billion per year (6). These high costs are largely related to the need for patient isolation,
53 expensive treatment, and extended hospital stays.

54 The cytolytic toxins TcdA and TcdB of *C. difficile* contribute directly to the pathology associated with
55 CDI (7), but other factors play a role in the colonization and pathogenicity of the bacterium. Among
56 these factors, the flagella conferring mobility and chemotaxis to the bacterium (8), play a role in the
57 intestinal inflammatory response by predominantly activating the NF- κ B signaling pathways via the
58 interaction with the Toll-like-receptor 5 (TLR5) (9). We recently reported *in vivo*, in a mouse model of
59 CDI, that the toxins act in cooperation with *C. difficile* flagella to induce an inflammatory response
60 suggesting a synergistic role of toxins and flagella in the intestinal inflammatory response (10). The
61 severity of intestinal inflammation is correlated with the severity of clinical presentations of CDI.

62 Different regulatory mechanisms of the TLR signaling pathways have been described. Among these,
63 microRNAs (miRNAs), a non-coding RNA sequences from 21 to 24 nucleotides, which are responsible
64 for post-transcriptional regulation of genes by their specific action on mRNAs (11), play a role as
65 immunomodulators of the innate response through the regulation of TLR-dependent signaling
66 pathways. Expression of miRNAs could be induced by the activation of TLRs to modulate the
67 inflammatory response by the inhibition of effectors of signaling cascades. They act on the
68 expression of effector targets, transcription factors of inflammation pathways and TLR receptors
69 themselves (12,13).

70 To date, only one study has reported an indirect link between CDI and miRNA (14). Viladomiu et al.
71 showed that the miR-146b is upregulated in colon of *C. difficile*-infected mice and targets the nuclear
72 receptor co-activator 4 (NCO4) resulting in the suppression of the peroxisome proliferator-activated
73 receptor (PPAR γ) in T cells. In this study, the loss of T cell-specific PPAR γ increased colonic

74 inflammatory lesions following CDI and the oral treatment of infected mice by an antagonist of
75 PPAR γ ameliorated colitis and inflammatory response.

76 In the current study, we demonstrate that miR-27a-5p is upregulated *in vitro* and *in vivo* following *C.*
77 *difficile* infection and its expression is induced by the activation of NF- κ B signaling pathway via the
78 interaction of the *C. difficile* flagellin with TLR5. By using miRNA inhibitor and mimics, we observed
79 that miR-27a-5p plays an anti-inflammatory role by downregulating the NF- κ B pathway.
80 Furthermore, intravenous injection of a miR-27a-5p mimic in a mouse model of CDI dramatically
81 decreased disease activity and intestinal inflammation. Altogether, our results suggest that miR-27a-
82 5p strongly regulates the pro-inflammatory flagella-induced signaling pathways and could be used as
83 an anti-inflammatory therapy for the control of severe forms of CDIs.

84

85 **Material and methods**

86 **Bacterial strains and spores**

87 The *C. difficile* R20291 wild-type 027 strain (WT) and its isogenic unflagellated mutant (*fliC*) obtained
88 by the ClosTron gene Knock-out system (15) were used. For *in-vitro* assays, the vegetative cells were
89 cultured in Brain Heart Infusion or broth (Oxoid) in an anaerobic chamber (atmosphere of 5% CO₂,
90 5% H₂ and 90% N₂) at 37°C. For mouse challenge, *C. difficile* spores were prepared as previously
91 described by Burns et al (16).

92 **Epithelial cell line culture**

93 Human intestinal epithelial cell line Caco-2 were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium
94 (DMEM, Gibco) supplemented with 15% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 1%
95 Non-essential amino acid (NEAA, Gibco). The cells were incubated at 37°C in a 10% CO₂ humidified
96 atmosphere. HeLa epithelial cells were cultured in modified Eagle's medium (MEM, Gibco)
97 supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 1% NEAA and 1% glutamine. The cells were incubated
98 at 37°C in a 5 % CO₂ humidified atmosphere.

99 **Cell line infection and treatment**

100 Cells were seeded on 24-well cell culture plates at a density of 5 x 10⁵ cells/well and assays were
101 established at 3 days post-confluence. For analyses of signaling pathways activation, cell monolayers
102 were FBS depleted for 4 hours before stimulation or infection. Cells were infected with *C. difficile* WT
103 strain or with its unflagellated mutant (10⁷ bacteria/ml) for 1 hour or incubated with 10 μ g/ml

104 recombinant FliC, purified as described previously (17), for 30 min to 12 hours. When indicated, NF- κ B
105 and MAPKs pathways were inhibited 1 h before cells stimulation or infection, by adding 20 μ M BMS
106 345541 (IKK α inhibitor) (Sigma), 20 μ M U0126 (MEK1/2 inhibitor), 20 μ M PD98059 (MEK1 inhibitor),
107 20 μ M SP600125 (JNK inhibitor) or 3 μ M SB203580 (p38 inhibitor) (Cell Signaling, Ozyme) to cell
108 monolayers.

109 **MicroRNA expression analysis**

110 MicroRNA expression analysis was performed using the miScript PCR array (Qiagen) containing 84
111 inflammation-related miRNAs primers. In addition, 20 miRNAs were selected by *in-silico* analysis
112 using TargetScan (www.targetscan.org, release 6.2), miRwalk ([www.ma.uni-
113 heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk](http://www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk), release 2.0) and miRgator (www.mirgator.krobic.re.kr, release 3.0)
114 miRNAs databases, or by scientific publications. Expression of these 20 miRNAs was also analyzed by
115 individual RT-qPCR (Table S1).

116 **MicroRNA overexpression and knockdown in Caco-2 cells**

117 The miR-27a-5p was overexpressed in Caco-2 cells using 25 nM Syn-hsa-miR-27a-5p mimic (miR-27a-
118 5p-mimic) whereas knockdown was achieved with 250 nM anti-hsa-miR-27a-5p (miR-27a-5p
119 inhibitor), both purchased from Qiagen. Before transfection, Caco-2 cells were seeded in 24-well
120 plate at 6×10^4 cells per well and transfected with HiPerfect Transfection Reagent (Qiagen) according
121 to manufacturer's instructions. Cells were incubated with transfection complexes under their normal
122 growth conditions and harvested 48 h after transfection. miScript Inhibitor Negative Control and
123 miScript Negative Control (Qiagen) were used as negative and positive control respectively. To
124 monitor the transfection efficiency, AllStars Hs Cell Death Control siRNA (Qiagen) was transfected
125 into cells in parallel in all transfections, and at least 75% transfection efficiency was achieved. The
126 miR-27a-5p level expression and the interleukin 8 (IL-8) and TNF α gene expressions, were analyzed
127 by quantitative RT-PCR, the degradation of the I κ B protein was assessed by Western blot, and the IL-
128 8 level in cells supernatant was dosed by ELISA.

129 **Animal model and treatment**

130 All animal experiments were performed in accordance with the Committee for Research and ethical
131 Issues of the International Association for the study of Pain (IASP) and the University Paris-Sud
132 guidelines for the husbandry of laboratory animals, and were approved by the Animal Welfare
133 Committee of the Paris-Sud University.

134 Female C57BL/6 mice (6-7 weeks-old) were purchased from Charles River (France) and female
135 C57BL/6 *tlr5*^{-/-} Knock-out (KO) mice were kindly provided by Thierry Pedron (Philippe Sansonetti
136 laboratory, Pasteur institute, Paris). CDI was established in mice as previously described (10). Briefly,
137 an antibiotic mixture (kanamycin, gentamicin, colistin, metronidazole and vancomycin) was
138 administrated to mice in drinking water for 3 days. Two days later, a single dose of clindamycin was
139 intraperitoneally injected. After 24 h, mice were orally gavaged with 10⁵ spores of *C. difficile* WT or
140 mutant strains or with water for control mice.

141 The miRNA solution used for the treatment of the mice was prepared by mixing the miR-27a-5p-
142 mimic or a mock nonfunctional oligonucleotide (synthesized by Riboxx®, Germany) with an *in vivo*
143 transfection reagent, the *in vivo*-jetPEI® (Polyplus-transfection®, France). Sequences of miR-27a-5p-
144 mimic and the mock negative control are shown in Supplementary Table S2. 50 µg of miR-27a-5p-
145 mimic or the mock negative control are diluted with sterile glucose solution (final glucose
146 concentration of 5%); 6 µL of *in vivo*-PEI reagent are diluted with a sterile glucose solution (final
147 glucose concentration of 5%), then these two solutions are mixed volume to volume (final
148 concentration of miRNAs of 0, 33 µg/µL). Mice were then treated with the miR-27a-5p-mimic or the
149 mock negative control/*in vivo*-jetPEI® suspension at 3 doses of 50 µg (ie 2,5 mg/kg), at the time of
150 infection, 8 h and 24 h post-infection, intravenously (150 µL retro-orbital injection). Signs of disease
151 (diarrhea, hunched posture and ruffled fur) were daily observed. Two days after challenge, mice
152 were euthanized and caecal tissues were collected for further analyses.

153 **Histological analysis**

154 The caecal tissues were fixed in 10% formalin for 24h, transferred into 70% ethanol and paraffin
155 embedded. Tissues sections were then processed to hematoxylin and eosin staining in the
156 Histological Platform of IPSIT (Clamart, France). Microscopic double-blinded analysis of slide
157 preparations was performed using NDP View software (Hamamatsu) on 10 different fields. A score of
158 degree of inflammation was established on the basis of submucosal edema, inflammatory infiltrate,
159 epithelial lesions and mucus cell (goblet Cells) loss (Supplementary Table S3) (18,19).

160 **RNA isolation and Real Time Quantitative PCR Analysis**

161 Tissues from the caecum were lysed using Lysing Matrix D and a FastPrep apparatus (MP
162 Biomedicals). Total RNA from lysed caecum and cell line were isolated using the miRNeasy Mini Kit
163 (Qiagen) for miRNA or the RNeasy Mini Kit (Qiagen) for mRNA expression analysis according to
164 manufacturer's instructions. RNA quantity was measured by NanoDrop analyzer (NanoDrop
165 technology) and quality was assessed by a 2100 Bioanalyser (Agilent). First strand cDNA was

166 generated for miRNA by using the miScript Reverse Transcription Kit (Qiagen), and Super Script III
167 reverse transcriptase (Invitrogen) with random primers for mRNA, using 2 µg of RNA for each
168 reaction.

169 qPCR reactions were run on a CFX96 Real-time system (Bio-Rad) with different reaction mix and
170 cycling conditions for mRNA and miRNA expression analysis. For miScript PCR array and miRNAs
171 expression individual analysis, miScript SYBR Green PCR (Qiagen) was used, and qPCR reactions were
172 performed in a 10 µl reaction volume containing 3 ng of cDNA, 9 µl of universal primer and master
173 mix, containing SYBR green and HotStarTaq DNA polymerase, included in the qPCR kit, and 500 nM
174 miRNA-specific primer. Cycling conditions started by 15 min polymerase activation at 95°C, then 40
175 cycles of 15 s denaturation at 94°C, 30 s hybridization at 55°C and 30 s elongation at 70°C. For mRNAs
176 expression analysis, qPCR was performed in a 10 µl reaction volume containing 3 ng of cDNA, 5 µl of
177 SSo Advanced™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and 500 nM gene-specific primers. Reactions were
178 run with the following cycling conditions: 30 s polymerase activation at 95°C and 40 cycles at 95°C for
179 5 s and 60°C for 10 s. An additional step from a start at 65°C to 95°C (0.5°C/0.5 s) was performed to
180 establish a melting curve. The mRNA and miRNAs expression level were normalized to the respective
181 expression of references genes GAPDH and SNORD2, using the $\Delta\Delta CT$ method (20). The primers are
182 listed in Supplementary Table S1.

183 **SDS-PAGE and Western blot analysis**

184 Cell monolayers were washed and frozen at -80°C for at least 15 min. Cells were then lysed in a
185 buffer containing PAGE 5X, 186 mM β -Mercaptoethanol, 1% bromophenol blue, 10 mM NaF, 25 mM
186 NaPPi and 1mM Na₃VO₄. Cecal tissue was disrupted and homogenized in the same lysis buffer using
187 Lysing Matrix D and a FastPrep apparatus (MP Biomedicals). After lysis, total proteins were separated
188 by SDS-PAGE on a 10% gel and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (GE
189 Healthcare). Membranes were then blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline (TBS) with
190 0.1% Tween for 1 hour at room temperature and probed overnight with specific anti-I κ B α , β -actin or
191 anti-RELA (Cell Signaling Technology). Membranes were then incubated with HRP-linked secondary
192 antibody (Cell Signaling Technology), and the chemiluminescence signal detection was assessed by
193 ECL plus kit (Millipore) and a Fusion FX Imaging System (Vilber Lourmat). The signal was
194 densitometrically analyzed using Fusion-CAPT software (Vilber Lourmat). Normalization was
195 performed by blotting the same membranes with anti- β -actin antibody (Millipore).

196

197

198 **Cytokine assays**

199 The levels of IL-8 pro inflammatory cytokine in Caco-2 cell free culture supernatants were evaluated
200 by ELISA using Human IL-8 ELISA KIT (4Abio, China) according to manufacturer's instructions. The
201 detection limit was 4 pg/ml.

202 **Luciferase assay**

203 Promega psiCHECK-2 plasmid cloned with the 3'-UTR from human *RELA* or a mutated nonfunctional
204 human *RELA* genes were constructed and kindly provided by Milagros Romay (Department of
205 microbiology, University of California, USA) (21). 15 ng per well of 3' UTR plasmid were transfected
206 along with miR-27a-5p-mimic into HeLa cells grown in 48-well plates for 24 h. Luciferase activity was
207 measured using the Luc-Pair Duo Luciferase Assay System from Genecopoeia (LF002). The amount of
208 Firefly luciferase activity was normalized to Renilla luciferase activity to account for transfection
209 efficiency in each well.

210 **Statistical analysis**

211 Results are expressed as means \pm sem. Distinct groups were compared by using Mann and Whitney
212 test performed using StatEL software. P values < 0.05 were considered statistically significant.

213

214 **Results**

215 **MiR-27a-5p is overexpressed in Caco-2 cell line stimulated by *C. difficile* flagellin or infected with**
216 **the R20291 WT strain but not by its unflagellated mutant.**

217 To identify miRNAs potentially involved in the regulation of *C. difficile*-flagella mediated
218 inflammation, we stimulated human intestinal Caco-2 cell monolayers over 30 min to 12 hours, by *C.*
219 *difficile* purified flagellin (FliC). MiRNAs screening was performed using miScript PCR array containing
220 84 inflammation related miRNAs primers. Additionally, we analyzed the expression of another *in-*
221 *silico*-selected 20 miRNAs. The selection was based on scientific publications indicating a link
222 between miRNAs and the different effectors of TLR5 signaling as a result of bacterial flagella
223 stimulation. We also relied on similarity between the 3'-UTR region of the mRNA sequence of
224 interest and the "seed sequence" of the miRNAs presents in the miRNA specific databases
225 TargetScan, miRgator and miRWalk. Results from qPCR analysis showed a significant overexpression
226 of miR-27a-5p in a time-dependent manner. The expression of this miRNA was rapidly increased by
227 8.5 fold after one hour of cells stimulation, and decreased from the second hour to achieve its basal
228 level after 6 hours of stimulation (Fig. 1A). Furthermore, overexpression of this miRNA was confirmed

229 when the cells were infected 1 h with *C. difficile* R20291 strain, while no overexpression was
230 observed when cells were infected with its unflagellated mutant (Fig. 1B). These results suggest that
231 the overexpression of miR-27a-5p is specifically induced by *C. difficile* flagella and it is not repressed
232 by the entire bacteria.

233 **MiR-27a-5p overexpression is induced by the *C. difficile*- or flagellin FliC activated NF- κ B pro-**
234 **inflammatory signaling pathway.**

235 In order to analyze the impact of the inhibition of NF- κ B and MAPKs signaling pathways (ERK1 / 2,
236 p38 and JNK) on the expression of miR-27a-5p, effectors of these pathways were chemically inhibited
237 by specific inhibitors of IKK α (NF- κ B pathway), and MAPKs ERK1/2, p38 and JNK, 1 h before
238 stimulation of cells by FliC or bacteria. After 1 h incubation of cells with FliC or strain R20291,
239 expression of miR-27a-5p was abolished (Fig 2A and B). A much stronger (approximately 40-fold)
240 inhibition of miR-27a-5p expression was obtained by the inhibitor of IKK α (BMS 345541) suggesting
241 that miR-27a-5p overexpression is induced by the activation of the pro-inflammatory NF- κ B signaling
242 by *C. difficile* and its flagellin (Fig. 2A and B).

243 **MiR-27a-5p-mimic inhibits the *C. difficile* flagellin-induced NF- κ B pro-inflammatory signaling**
244 **pathway *in vitro*.**

245 To investigate the role of miR-27a-5p in the regulation of the *C. difficile* flagellin-induced NF- κ B
246 signaling pathway, we used oligonucleotides mimicking the activity of this miR-27a-5p (miR-27a-5p-
247 mimic) or antagonizing its activity (miR-27a-5p inhibitor). After transfection of Caco-2 cells by the
248 respective miR-27a-5p-mimic, miR-27a-5p inhibitor, as well as by the respective oligonucleotide
249 mimic and inhibitor mock controls, the expression of miR-27a-5p was measured after cell lysis. As
250 shown in Fig. 3A, the miR-27a-5p inhibitor significantly reduced expression of this miRNA in FliC-
251 stimulated cells, whereas miR-27a mimic was strongly expressed compared to respective control FliC-
252 stimulated cells. The effect of transfection on cells by these two molecules was measured by the
253 degradation of the effector I κ B- α which indicates the activation of the NF- κ B pathway, the
254 expression of pro-inflammatory cytokines TNF α and IL-8, as well as the production of IL-8 in the cell
255 culture supernatants. The miR-27a-5p inhibitor induces a strong degradation of I κ B- α , an increased
256 expression of TNF α and IL-8 cytokine mRNAs, as well as an increase in IL-8 synthesis in the culture
257 supernatant (Fig. 3B, C and D), suggesting that miR-27a-5p plays an inhibitory role of the NF- κ B
258 pathway and thus an anti-inflammatory role in the signaling cascade induced by the FliC-TLR5
259 interaction. According with these observations, the transfection of cells with the miR-27a-5p-mimic
260 induced an anti-inflammatory cell response characterized by the absence of degradation of I κ B- α and

261 thus the activation of NF- κ B, a strong inhibition of the TNF α and IL-8 cytokine mRNA expression, and
262 lack of IL-8 synthesis in the cell supernatant (Fig. 3B, C and D). All these observations show that miR-
263 27a-5p could play an inhibitory role of the NF- κ B pro-inflammatory pathway following the activation
264 of this pathway by the *C. difficile* flagellin-TLR5 interaction. This miRNA would play in an important
265 feedback loop of the TLR5-NF- κ B signaling cascade.

266 **MiR-27a-5p is strongly overexpressed *in vivo* in the caecum of *C. difficile*-infected mice.**

267 In order to confirm the observations made *in vitro* regarding the potential role of miR-27a-5p in the
268 regulation of inflammation induced by *C. difficile* and its flagella, we analyzed the expression of this
269 miR-27a-5p in the intestine (caecum) during infection on the ICD mouse model. Three groups of
270 conventional microbiota C57BL/6 female 4 to 5 weeks old mice (n = 10 for each group) and one
271 group of C57BL/6 KO *tlr5*^{-/-} mice (not expressing TLR5, n = 10) have been formed. After the antibiotic
272 treatment of the animals for 6 days preceding the infection in order to create dysbiosis (see
273 Materials and Methods), a group of conventional microbiota mice was infected by oral gavage with
274 the *C. difficile* wild type strain R20291 (WT), and another one with the isogenic mutant lacking
275 flagella (FliC-). A group of *tlr5*^{-/-} KO mice was also infected with the WT strain. A group of uninfected
276 conventional microbiota mice served as control to establish relative expression ratios for each group.
277 Analysis of miR-27a-5p expression in the animal's caecum showed a higher expression of this miRNA
278 in the caecum of conventional microbiota C57BL/6 mice infected with the WT strain, compared to
279 the expression observed in the mice infected with the non-flagellated mutant (FliC-) and that of the
280 KO *tlr5*^{-/-} mice infected with the WT strain (Fig. 4A). Moreover, the analysis of the mRNA expression
281 of the cytokine KC gene in mice, equivalent to the human IL-8, reveals a perfect correlation with the
282 increased expression of miR-27a-5p as shown in Fig. 4B These results indicate that the flagella of *C.*
283 *difficile*, through its interaction with TLR5 plays a role in the increased expression of miR-27-a-5p in
284 the caecum of mice, suggesting that *in vivo* the activation of NF- κ B following the flagella-TLR5
285 interaction previously reported (10), is correlated with the expression of miR-27a-5p.

286 **MiR-27a- 5p-mimic reduces the severity of inflammation *in vivo* in the murine model of ICD.**

287 Given the anti-inflammatory effects induced by miR-27a-5p in Caco-2 cells, we analyzed the effect of
288 an oligonucleotide mimicking this miRNA (miR-27a-5p-mimic) administered intravenously (IV) in the
289 ICD mouse model (Fig. 5). Different groups of mice were tested (Table 1). After antibiotic treatment
290 induced-dysbiosis, a group of uninfected animals was treated or not intravenously with a miR-27a-5p
291 mimic/*in vivo*-jetPEI® suspension (see Materials and Methods) at 3 doses (at time of infection, 8 h
292 and 24 h after infection). A second group of animals was infected with the WT strain R20291 and

293 intravenously injected or not with the mock negative control; a third group was also infected with
294 this strain but treated with the miR-27a-5p mimic/in vivo-jetPEI® as for the first group.

295 As expected in this CDI model, following infection, mice infected and untreated or treated with the
296 mock negative control developed clinical signs of CDI: diarrhea, ruffled fur and decreased activity, at
297 day 1 and 2 post-infection with 19% of mortality. In contrast, only 5 out of 16 animals in the group of
298 infected mice and treated with miR-27a-5p-mimic developed diarrhea at day 2 post-infection with no
299 mortality observed in this group. It should be noted that the rate of intestinal colonization of infected
300 animals quantified by bacterial count in the caecal content (colony-forming units- CFU/g) at day 2
301 post-infection is quite equivalent between all groups of infected mice. Thus, differences observed in
302 clinical outcomes between these groups could not be explained by differences intestinal colonization
303 rate of the mice.

304 On day 2 post-infection, the histological analysis of the caecum of the WT-infected and untreated
305 animals showed an inflammatory hyperemic appearance with hemorrhagic zones and poor caecal
306 content with mucus compared to the normal caecum of uninfected mice as shown in Fig. 5A and C.
307 The inflammation level of the caecal mucosa was largely attenuated in the group of mice infected
308 and treated with the miR-27a-5p-mimic (Fig. 5E). Histological analysis of caecal sections, showed as
309 expected, a significant mucosal edema with inflammatory infiltrate, epithelial erosion and loss of
310 goblet cells in the caecum of mice infected with the WT strain treated or not with the mock negative
311 control, reaching an inflammation score (Table S3) ranging from 5 to 9, compared to a score of 0 for
312 uninfected mice (Fig. 5G, Table 1). On the other hand, in the group of animals infected and treated
313 with the miR-27a-5p-mimic, 11 out of 16 mice presented no or weak inflammation and normal caecal
314 content without mucus (Fig. 5E). Histological inflammation score was less than 5 for these animals,
315 which showed only a cellular infiltrate and mild to moderate edema (Fig. 5F and G). The miR-27a-5p-
316 mimic-treated infected mice which developed diarrhea at day 2 post-infection showed a high
317 inflammation score as for infected and untreated mice (Fig. 5G), corresponding to a 70% of efficiency
318 for the miR-27a-5p-mimic to reduce the level of inflammation on this mouse model of infection.

319 The analysis of the activation of the NF- κ B pathway in the caecal tissue at day 2 post-infection,
320 revealed a strong degradation of I κ B- α in the caecum of the infected and untreated mice, compared
321 to uninfected mice, which corresponds, as for the clinical manifestations, to the usual observations
322 on this CDI model (10). In contrast, no activation of I κ B- α was detected in the caecum of mice
323 infected and treated with miR-27a-5p-mimic (Fig. 5H). Expression of proinflammatory cytokine genes
324 (IL-8, IL-6 and TNF- α) was also downregulated in the caecum of mice infected and treated with miR-
325 27a-5p-mimic (Table 2). Altogether, these results reinforce the previous observations regarding the

326 reduction of clinical manifestations and inflammatory phenomena associated with *C. difficile*
327 infection in this mouse model and strongly suggest that miR-27a-5p downregulates *in vivo* the
328 bacterial induced intestinal inflammation.

329 **MiR-27a-5p could targets RELA**

330 To identify the molecular targets of miR-27a-5p, we used miRNA-targets prediction database to find
331 a suitable NF- κ B signaling pathway related-target. In agreement with this, TargetScan database lists
332 RELA as one of the potential targets of miR-27a-5p. RELA has a miR-27a-5p seed sequence
333 complementarity of 6 bases in its 3' UTR (Fig. 6A). RELA is a functional subunit of the NF- κ B forming
334 complex (p50-RELA) that is essential for the NF- κ B-related genes transcription (22). Western blot
335 analysis from FliC-stimulated and transfected with miR-27a-5p inhibitor Caco-2 cells show a
336 significant increased production level of human RELA protein while miR-27a mimic significantly
337 decreased it compared to FliC-stimulated control cells (Fig. 6B). In contrast, no difference in the
338 RELA-mRNA expression level following miR-27a-5p inhibitor or mimic transfection was observed
339 (data not shown), which could be explained by the mechanism of action of the miRNAs themselves
340 which consists on a post-transcriptional regulation of genes. Overexpression of miR-27a-5b inhibits
341 the activity of a luciferase constructs containing *RELA* 3'UTR. In contrast, the activity of constructs
342 containing the site mutant 3'UTR of *RELA* was not inhibited by overexpressing the miR-27a-5p (Fig
343 6C). These results suggest that RELA could be directly targeted by miR-27a-5p. However, further
344 studies are required to identify other more interesting targets of miR-27a-5p.

345

346 **Discussion**

347 *C. difficile* infections induce significant intestinal inflammation which is responsible for the largest
348 part of the clinical outcome of these infections. Indeed, CDIs have been associated to fecal markers
349 of inflammation and not to markers of bacterial infection. For example, El Feghaly et al. conducted a
350 prospective study including 120 patients hospitalized and infected with *C. difficile*, of whom 62%
351 developed persistent diarrhea for more than five days after initiation of a treatment with vancomycin
352 or metronidazole (23). In these patients, the fecal bacterial load decreased with antibiotic therapy
353 and was never correlated with the severity of the disease. In contrast, the fecal level of pro-
354 inflammatory cytokines IL-8 and CXCL5 mRNAs, as well as that of the IL-8 protein, was strongly
355 correlated with the persistence and severity of the disease.

356 Several bacterial factors have been described to induce a pro-inflammatory response after early
357 interaction with intestinal epithelial cells, particularly *C. difficile* toxins TcdA and TcdB which have long

358 been considered as the only virulence factors responsible for intestinal lesions observed during ICDs
359 (24). Bacterial flagella may be involved in the development of a deleterious inflammatory response in
360 the mucosa (25). We have recently reported for the first time in a *in vivo* mouse model, that the
361 action of toxins alone, without the flagellin, is not sufficient to elicit the important level of intestinal
362 epithelial lesions observed in infected mice since absence of flagella in bacteria producing TcdA and
363 TcdB toxins significantly reduces the degree of inflammation of the intestinal mucosa (9). The
364 activation of the NF- κ B signaling pathway by flagella could largely contribute to the amplification of
365 the bacterial associated-inflammatory response of the host.

366 In this work we studied the regulation of the intestinal inflammation induced by *C. difficile*. Indeed,
367 the activation of the innate immune response via TLRs-dependent signaling pathways is necessary for
368 the clearance of pathogens. However, excessive activation of these pathways could disrupt cellular
369 and immune homeostasis and cause tissues lesions. Controlling of the *C. difficile*-induced
370 inflammatory signaling cascades could limit the intensity of the intestinal lesions and the incidence of
371 severe forms of infection leading to a more efficient and faster recovery of patients. Among the
372 regulatory mechanisms of the TLR signaling pathways, we focused our interest on microRNAs which
373 are short non-coding natural RNA sequences, from 21 to 24 nucleotides, responsible for the post-
374 transcriptional regulation of genes. It has been shown that miRNAs play an important role in the
375 modulation of TLR signaling pathways, and can act at different levels: regulation of TLR gene
376 expression themselves, signaling effectors and regulators, transcription factors as well as genes
377 encoding cytokines (26). To date, only one study has linked CDIs with miRNAs (27). In this article the
378 authors characterized the role of PPAR γ in *C. difficile* infection. For this, they used a mouse model of
379 CDI and KO mice for PPAR γ T cells. After analysis of miRNA expression, it was observed that miR-146b
380 was overexpressed in the colon of *C. difficile*-infected mice. From their observations, the authors
381 conclude that the activation of miR-146b and PPAR γ is involved in the regulation of Th17 cell
382 response in *C. difficile*-induced colitis in mice (27).

383 In order to study the expression of miRNAs potentially associated with the *C. difficile* flagellin-
384 induced inflammatory response, we performed a restricted screening approach by selecting miRNAs
385 already described as playing an important role in inflammation signaling pathways. Of the miRNAs
386 studied, miR-27a-5p was overexpressed *in vitro* in *C. difficile*-infected Caco-2 cells and *in vivo* in the
387 mouse ICD model. This overexpression of miR-27a-5p was not observed when mice were infected
388 by unflagellated mutant or when KO *tlr5*^{-/-} mice were infected by the WT strain, suggesting a
389 specifically induced overexpression by the flagellin of *C. difficile* via the TLR5-FliC interaction.

390 We investigated the impact of the inhibition of the NF- κ B signaling pathways and MAPKs to
391 determine which pathway is involved in the miR-27a-5p overexpression. We observed a very strong
392 inhibition of the miR-27a-5p expression in FliC- or bacterial stimulated cells treated with a chemical
393 inhibitor of the NF- κ B signaling pathway. This suggests that overexpression of the miR-27a-5p is
394 induced following the activation of the NF- κ B pathway. A similar degree of inhibition of miR-27a-5p
395 expression was not observed during inhibition of MAPK pathways. By using an anti-miR-27a-5p or a
396 miR-27a-5p-mimic we identified an anti-inflammatory role for this miRNA in the *C. difficile*-
397 stimulated Caco-2 intestinal epithelial cell model. This anti-inflammatory activity of the miR-27a-5p
398 suggests that this miRNA could act as a negative feedback loop where the activation of the NF- κ B
399 pro-inflammatory pathway following the TLR5-FliC interaction induces overexpression of the miR-
400 27a-5p which in turn exerts an anti-inflammatory activity by inhibiting at different possible levels the
401 effectors of the NF- κ B pathway itself. The role of the miR-27a-5p in the regulation of MAPK pathways
402 has not been studied in this work; therefore further studies are necessary to analyze the impact of
403 this miRNA on these signaling pathways.

404 In this work we showed the proof of concept of the *in vivo* anti-inflammatory effect of the miR-27a-
405 5p in a mouse model of CDI. Indeed, 70% of mice infected and treated with miR-27a-5p-mimic
406 showed no evidence of CDI, while the remaining 30% of mice only developed simple diarrhea with no
407 or mild intestinal inflammation without mortality. All the inflammatory markers (histological
408 inflammatory score, pro-inflammatory cytokine gene expression or I κ B- α degradation) were
409 attenuated in the caecum of these mice. Therefore, the miR-27a-5p-mimic could be a good candidate
410 for developing a miRNA based therapeutic approach against the intestinal inflammation responsible
411 for severe clinical outcome of CDI. The miR-27a-5p could be used in combination with antibiotic
412 therapy for the treatment of moderate-to-severe CDIs to modulate the activation of the NF- κ B
413 signaling pathway by mimicking the anti-inflammatory activity in the negative feedback loop of
414 natural miR-27a-5p and controlling the continuous cycles of activation of this pro-inflammatory
415 pathway.

416 The anti-inflammatory role of miR-27a-5p has been described in tissues other than the intestinal
417 epithelium. For example, miR-27a-5p is involved in the regulation of the inflammatory response of
418 human aortic endothelial cells via the NF- κ B pathway in response to oxidized glycerophospholipids
419 and IL-1B (21). Similarly, miR-27a-5p expression is decreased in interstitial mitral valve cells in
420 response to TNF- α , and its overexpression by a miR-27a-5p-mimic modulates the Jnk and β catenin-
421 signaling pathway and protects interstitial cells from cellular damage induced by TNF- α (28).
422 Moreover, miR-27a-5p-mimic attenuates inflammatory damage induced by ischemia-reperfusion to

423 the blood-brain barrier by down-regulating TICAM-2 (a TLR4-responsive adapter) and inhibiting the
424 NF- κ B/IL-1 β pathway (29). In particular, the role of miRNAs has been extensively studied in chronic
425 inflammatory bowel diseases (IBD) - Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) and a large
426 number of miRNAs may have either an anti-inflammatory or pro-inflammatory role in the context of
427 these diseases (30). Nevertheless, the role of miR27a-5p in these chronic diseases remains to be
428 established.

429 Given the diverse biological functions of miR-27a-5p, toxicity or specificity of this miRNA could be
430 discussed. It is therefore necessary to identify the direct cellular targets of miR-27a-5p in order to
431 better characterize its mechanism of action. In our work, we identified RelA as a potential target for
432 miR-27a-5p based on sequence homology and the construction of a luciferase reporter containing
433 the RelA 3'-UTR region. Nevertheless, this approach could generate false-positive results. Techniques
434 that allow direct identification of endogenous miRNA targets exist and will be considered for
435 identification of the miR-27a-5p targets.

436 The anti-inflammatory effect of miR-27a-5p-mimic observed in this work may provide new insight in
437 the CDI pathogenesis and allows to consider a novel therapeutic approach specifically targeting the
438 *C. difficile*-induced TLR5-NF- κ B inflammatory signaling pathway to reduce deleterious host response
439 responsible for tissue damage and severe clinical manifestations of CDI.

440

441 **Acknowledgments**

442 We thank Thierry Pedron (Philippe Sansonetti laboratory, Pasteur institute, Paris) for kindly provided
443 female C57BL/6 *tlr5*^{-/-} Knock-out. We also thank Milagros Romay (Department of microbiology,
444 University of California, USA) for kindly provided psiCHECK-2 *RELA* plasmids. We sincerely thank the
445 technical assistance of Claudine Delomenie (Region Ile de France, IFR141 IPSIT) for RT-qPCR analyses
446 and Valérie Domergues for animal facilities.

447

448

449

450

451

452

453 **References**

- 454 1. Cloud J, Kelly CP. Update on Clostridium difficile associated disease. *Curr Opin Gastroenterol.*
455 *janv 2007;23(1):4-9.*
- 456 2. Heinlen L, Ballard JD. Clostridium difficile infection. *Am J Med Sci.* sept 2010;340(3):247-52.
- 457 3. Dubberke ER, Olsen MA. Burden of Clostridium difficile on the Healthcare System. *Clin Infect*
458 *Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 août 2012;55(Suppl 2):S88-92.
- 459 4. Miller MA, Hyland M, Ofner-Agostini M, Gourdeau M, Ishak M, Canadian Hospital Epidemiology
460 Committee. Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Morbidity, mortality, and
461 healthcare burden of nosocomial Clostridium difficile-associated diarrhea in Canadian hospitals.
462 *Infect Control Hosp Epidemiol.* mars 2002;23(3):137-40.
- 463 5. Wiegand PN, Nathwani D, Wilcox MH, Stephens J, Shelbaya A, Haider S. Clinical and economic
464 burden of Clostridium difficile infection in Europe: a systematic review of healthcare-facility-
465 acquired infection. *J Hosp Infect.* mai 2012;81(1):1-14.
- 466 6. Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P, ESCMID Study Group for Clostridium difficile, EU Member States,
467 European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of Clostridium difficile-
468 associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin*
469 *Microbiol Infect Dis.* oct 2006;12 Suppl 6:2-18.
- 470 7. Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A, Minton NP. The role of toxin A and
471 toxin B in Clostridium difficile infection. *Nature.* 7 oct 2010;467(7316):711-3.
- 472 8. Tasteyre A, Barc MC, Collignon A, Boureau H, Karjalainen T. Role of FliC and FliD flagellar
473 proteins of Clostridium difficile in adherence and gut colonization. *Infect Immun.* déc
474 2001;69(12):7937-40.
- 475 9. Batah J, Denève-Larrazet C, Jolivot P-A, Kuehne S, Collignon A, Marvaud J-C, et al. Clostridium
476 difficile flagella predominantly activate TLR5-linked NF-κB pathway in epithelial cells. *Anaerobe.*
477 *avr 2016;38:116-24.*
- 478 10. Batah J, Kobeissy H, Bui Pham PT, Denève-Larrazet C, Kuehne S, Collignon A, et al. Clostridium
479 difficile flagella induce a pro-inflammatory response in intestinal epithelium of mice in
480 cooperation with toxins. *Sci Rep.* 12 juin 2017;7.
- 481 11. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, et al. Identification of hundreds of
482 conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet.* juill 2005;37(7):766-70.
- 483 12. He X, Jing Z, Cheng G. MicroRNAs: New Regulators of Toll-Like Receptor Signalling Pathways.
484 *BioMed Res Int.* 20 mars 2014;2014:e945169.
- 485 13. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF-κB-dependent induction of microRNA
486 miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl*
487 *Acad Sci U S A.* 15 août 2006;103(33):12481-6.
- 488 14. Viladomiu M, Hontecillas R, Pedragosa M, Carbo A, Hoops S, Michalak P, et al. Modeling the
489 Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and MicroRNA-146 in Mucosal Immune
490 Responses to Clostridium difficile. *PLoS ONE.* 7(10).

- 491 15. Minton N, Carter G, Herbert M, O'keeffe T, Purdy D, Elmore M, et al. The development of
492 Clostridium difficile genetic systems. *Anaerobe*. avr 2004;10(2):75-84.
- 493 16. Burns DA, Heeg D, Cartman ST, Minton NP. Reconsidering the sporulation characteristics of
494 hypervirulent Clostridium difficile BI/NAP1/027. *PLoS One*. 2011;6(9):e24894.
- 495 17. Batah J, Kansau I. Intestinal Epithelial Cell Response to Clostridium difficile Flagella. *Methods*
496 *Mol Biol Clifton NJ*. 2016;1476:103-16.
- 497 18. Lai MA, Quarles EK, López-Yglesias AH, Zhao X, Hajjar AM, Smith KD. Innate immune detection
498 of flagellin positively and negatively regulates salmonella infection. *PLoS One*.
499 2013;8(8):e72047.
- 500 19. Theriot CM, Koumpouras CC, Carlson PE, Bergin II, Aronoff DM, Young VB. Cefoperazone-
501 treated mice as an experimental platform to assess differential virulence of Clostridium difficile
502 strains. *Gut Microbes*. déc 2011;2(6):326-34.
- 503 20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative
504 PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods San Diego Calif*. déc 2001;25(4):402-8.
- 505 21. Romay MC, Che N, Becker SN, Pouldar D, Hagopian R, Xiao X, et al. Regulation of NF- κ B
506 signaling by oxidized glycerophospholipid and IL-1 β induced miRs-21-3p and -27a-5p in human
507 aortic endothelial cells. *J Lipid Res*. janv 2015;56(1):38-50.
- 508 22. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 30 oct
509 2006;25(51):6680-4.
- 510 23. El Feghaly RE, Stauber JL, Deych E, Gonzalez C, Tarr PI, Haslam DB. Markers of intestinal
511 inflammation, not bacterial burden, correlate with clinical outcomes in Clostridium difficile
512 infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. juin 2013;56(12):1713-21.
- 513 24. Shen A. Clostridium difficile toxins: mediators of inflammation. *J Innate Immun*.
514 2012;4(2):149-58.
- 515 25. Ramos HC, Rumbo M, Sirard J-C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host
516 immune responses in mucosa. *Trends Microbiol*. nov 2004;12(11):509-17.
- 517 26. O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat*
518 *Rev Immunol*. mars 2011;11(3):163-75.
- 519 27. Viladomiu M, Hontecillas R, Pedragosa M, Carbo A, Hoops S, Michalak P, et al. Modeling the
520 role of peroxisome proliferator-activated receptor γ and microRNA-146 in mucosal immune
521 responses to Clostridium difficile. *PLoS One*. 2012;7(10):e47525.
- 522 28. Chen H, Zhang Z, Zhang L, Wang J, Zhang M, Zhu B. miR-27a protects human mitral valve
523 interstitial cell from TNF- α -induced inflammatory injury via up-regulation of NELL-1. *Braz J Med*
524 *Biol Res*. 51(6).
- 525 29. Li X-Q, Lv H-W, Wang Z-L, Tan W-F, Fang B, Ma H. MiR-27a ameliorates inflammatory damage
526 to the blood-spinal cord barrier after spinal cord ischemia: reperfusion injury in rats by
527 downregulating TICAM-2 of the TLR4 signaling pathway. *J Neuroinflammation*. 7 févr
528 2015;12:25.

- 529 30. Tili E, Michaille J-J, Piurowski V, Rigot B, Croce CM. MicroRNAs in intestinal barrier function,
530 inflammatory bowel disease and related cancers-their effects and therapeutic potentials. *Curr*
531 *Opin Pharmacol.* 2017;37:142-50.
- 532 31. Häsler R, Jacobs G, Till A, Grabe N, Cordes C, Nikolaus S, et al. Microbial pattern recognition
533 causes distinct functional micro-RNA signatures in primary human monocytes. *PLoS One.*
534 2012;7(2):e31151.
- 535 32. Norman E, Buroker X-HN. *Medical Diagnostic Methods* Circulating miRNAs from Dried Blood
536 Spots are Associated with High Altitude Sickness. 2013;
- 537 33. Nahid MA, Yao B, Dominguez-Gutierrez PR, Kesavalu L, Satoh M, Chan EKL. Regulation of TLR2-
538 mediated tolerance and cross-tolerance through IRAK4 modulation by miR-132 and miR-212. *J*
539 *Immunol Baltim Md* 1950. 1 févr 2013;190(3):1250-63.
- 540 34. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Park Y-J, Tsuruta Y, Abraham E. miR-147, a microRNA that is induced
541 upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses.
542 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 sept 2009;106(37):15819-24.
- 543 35. Ceppi M, Pereira PM, Dunand-Sauthier I, Barras E, Reith W, Santos MA, et al. MicroRNA-155
544 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic
545 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24 févr 2009;106(8):2735-40.
- 546 36. Lu Z, Li Y, Takwi A, Li B, Zhang J, Conklin DJ, et al. miR-301a as an NF- κ B activator in pancreatic
547 cancer cells. *EMBO J.* 5 janv 2011;30(1):57-67.
- 548 37. Wang B, Howel P, Bruheim S, Ju J, Owen LB, Fodstad O, et al. Systematic Evaluation of Three
549 microRNA Profiling Platforms: Microarray, Beads Array, and Quantitative Real-Time PCR Array.
550 *PLoS ONE.* 11 févr 2011;6(2):e17167.
- 551

552 **FIGURE LEGENDS**

553 **Figure 1. MiR-27a-5p is overexpressed in Caco-2 cells incubated with flagellin FliC or *C. difficile*.** (A)
554 Kinetics of expression of miR-27a-5p by Caco-2 cells incubated with FliC for 12 h. (B) Cells were
555 incubated with FliC or infected with the wild type strain R20291 (WT) or its unflagellated mutant
556 (FliC-) for 1 h. The expression of miR-27a-5p was measured by qRT-PCR with the oligonucleotide of
557 Supplementary Table S1. The bars on each point correspond to the standard deviations of the
558 averages of at least 3 independent experiments.

559 **Figure 2. Inhibition of miR-27a-5p overexpression by specific NF- κ B and MAPKs chemical inhibitors**
560 **in Caco-2 cells incubated with FliC flagellin or *C. difficile* R20291 strain.** The NF- κ B and MAPKs
561 pathways were inhibited 1 h before stimulation or infection of the cells, with BMS 345541 (IKK α
562 inhibitor), U0126 (MEK1/2 inhibitor), PD98059 (MEK1 inhibitor), SP600125 (JNK inhibitor) or
563 SB203580 (p38 inhibitor). Expression of miR-27a-5p was analyzed after incubation of cells with FliC
564 (A) or infection with wild-type strain R20291 (WT) (B) for 1 h. The expression of miRNAs was
565 measured by qRT-PCR with the oligonucleotide of Supplementary Table S1. The bars on each point
566 correspond to the standard deviations of the averages of at least 3 independent experiments.

567 **Figure 3. Inhibitory effect of miR-27a-5p on the NF- κ B pathway in Caco-2 cells incubated with**
568 **flagellin.** Caco-2 cells were transfected with the respective miR-27a-5p-mimic, miR-27a-5p inhibitor,
569 as well as with the respective oligonucleotide mimic and inhibitor controls (Supplementary Table S2).
570 Expression of miR-27a-5p was measured by qRT-PCR (A). The degradation of the effector I κ B- α
571 indicating the activation of the NF- κ B pathway was measured by Western-blot (B). (C) The expression
572 of the pro-inflammatory cytokine TNF α and IL-8 mRNAs (oligonucleotides Supplementary Table S4),
573 as well as (D) the production of IL-8 in the cell culture supernatant by ELISA was also measured. The
574 bars on each point correspond to the means \pm standard deviations, for at least 3 independent
575 experiments (* p <0.01).

576 **Figure 4. Expression of miR-27a-5p in the caecum of *C. difficile*-infected mice.** (A) Expression of mir-
577 27a-5p as measured by qPCR in the cecum of conventional microbiota mice infected with the wild
578 type strain R20291 (WT) or the non-flagellated isogenic mutant (FliC-). The third group corresponds
579 to the expression of mir-27a-5p in KO tlr5^{-/-} mice infected with the WT strain. The horizontal bars
580 correspond to the averages per group. (B) Correlation of mir-27a-5p expression with the expression
581 of KC mRNA (human IL-8 equivalent, oligonucleotides Supplementary Table S4) in the caecum of
582 conventional mice infected by the R20291 WT strain.

583 **Figure 5. Mir-27a-5p-mimic attenuates caecal inflammation *C. difficile* infected mice.** Groups of
584 C57BL/6 mice with conventional microbiota (n = 9-10) were infected and treated with or without
585 miR-27a-5p-mimic. The caecums were collected at day 2 post-infection. Caecum and representative
586 histological section (A, B) of a control mouse (uninfected and treated with miR-27a-5p-mimic), (C, D)
587 of a mouse infected with wild type strain R20291 (WT) and (E, F) of a mouse infected with the same
588 strain and treated with the miR-27a-5p-mimic. (G) Histological inflammation scores for individual
589 mice in each group. The horizontal lines represent the average scores for each group (score 0 for the
590 control group not shown). The red circle indicates the 3 animals which developed CDI symptoms. (H)
591 Western blots from caecum lysates revealed using antibodies against I κ B- α and actin. The density of
592 the bands was measured using Fusion software and the I κ B- α /actin ratios were calculated. For the
593 negative control, the ratio was normalized to 1 and the ratios of the other samples were reported to
594 the negative control. The bars on each point correspond to the mean \pm standard deviation for each
595 group of animals (*p <0.05).

596 **Figure 6. RelA expression may be regulated by miR-27a-5p.** (A) Predicted miR-27a-5p binding sites in
597 the 3'UTR of human *RELA* with sequence complementarity of the 6 nucleotides seed sequence
598 indicated, as predicted by miRNA database « Targetscan ». (B) RelA protein level in Caco-2 cells
599 stimulated with FlIC and transfected by miR-27a-5p inhibitor /mimic or their respective control,
600 measured by Western-blot. (C) Luciferase assays using a reporter vector (psiCHECK2) carrying the
601 3'UTR of *RELA* in HeLa cells transfected with negative control miRNA mimic (Mock) or miR-27a-5p-
602 mimic. The bars on each point correspond to the means \pm standard deviations, for at least 3
603 independent experiments (* p <0.01).

604

605

Table 1. Groups of mice used in experiments on the effect of the miR-27a-5p mimic on *C. difficile*-induced caecal inflammation.

Mice Groups	N°	Clinical outcome*	Histological inflammation score	Mortality
Uninfected control				
Uninfected - Untreated	5	– (100%)	0	0
Uninfected + miR-27a-5p-mimic	10	– (100%)	0	0
<i>C. difficile</i> infected mice control				
Infected	10	++ (100%)	5-9	2
Infected + Mock control	6	++ (100%)	**	1
<i>C. difficile</i> infected + miR-27a-5p-mimic				
	16	++ (30 %) – (70%)	5-9 0-4	0 0

*Diarrhea, ruffled fur and reduced activity; ** In progress

Table 2. Fold expression of pro-inflammatory cytokine encoding genes in *C. difficile*-infected and/or treated mice.

Infected mice set	Genes*		
	KC	IL-6	TNF α
R20291 WT strain + mock	278.11	15.57	8.65
R20291 WT + miR-27a-5p-mimic	32.26	3.3	4.48

*The mean Ct from each group is reported to those of the negative control and the expression of the GAPDH gene for each set.

Figure 1.

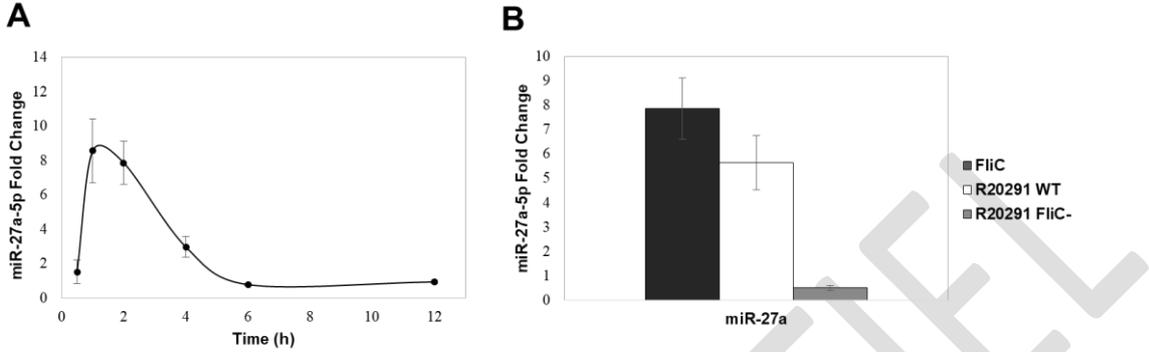


Figure 2.

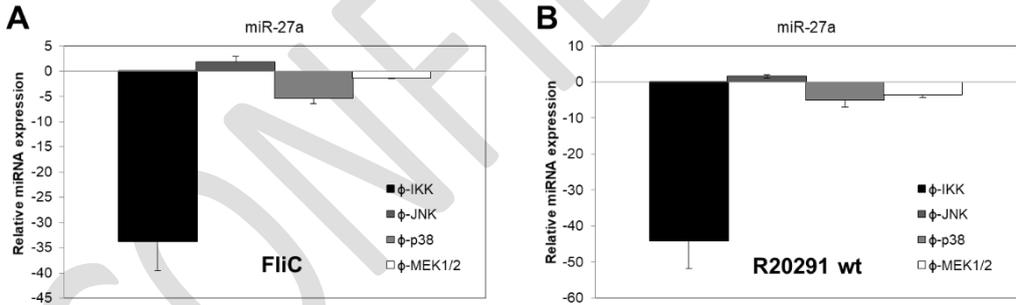


Figure 3.

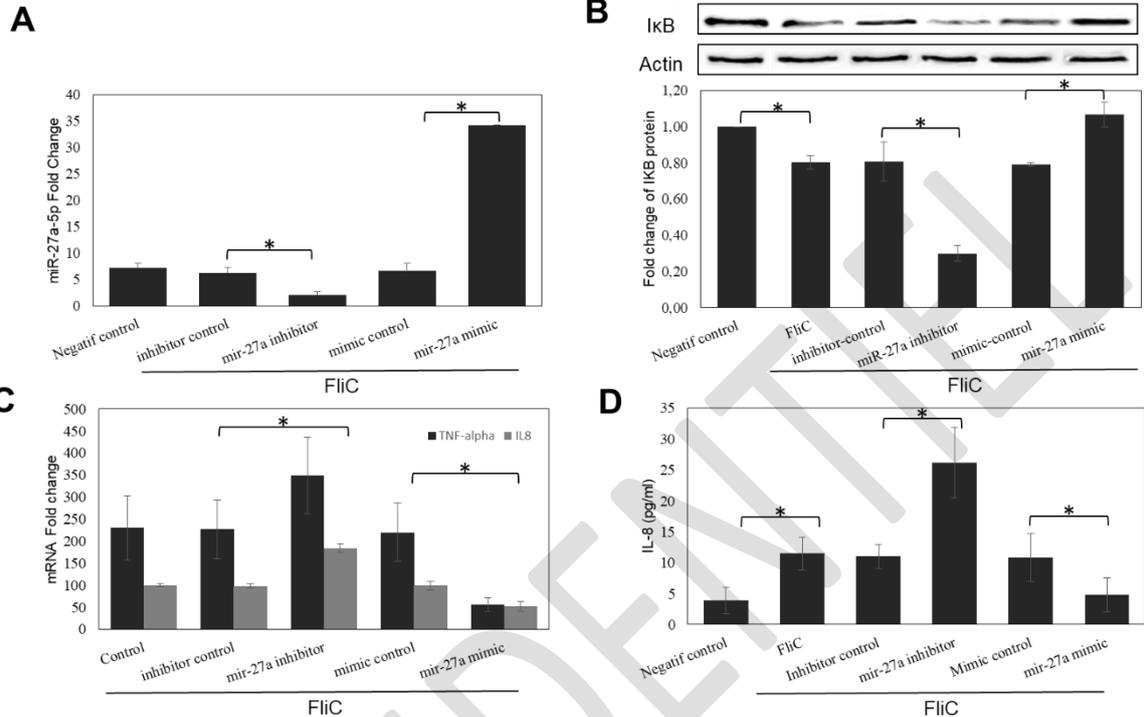


Figure 4.

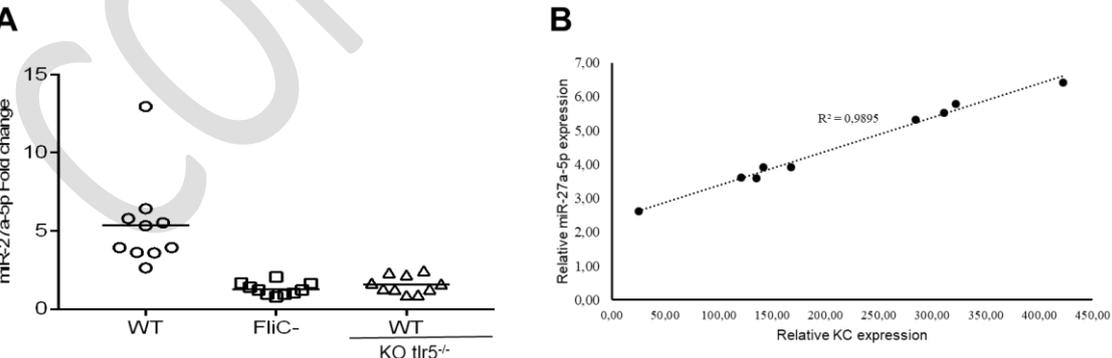


Figure 5.

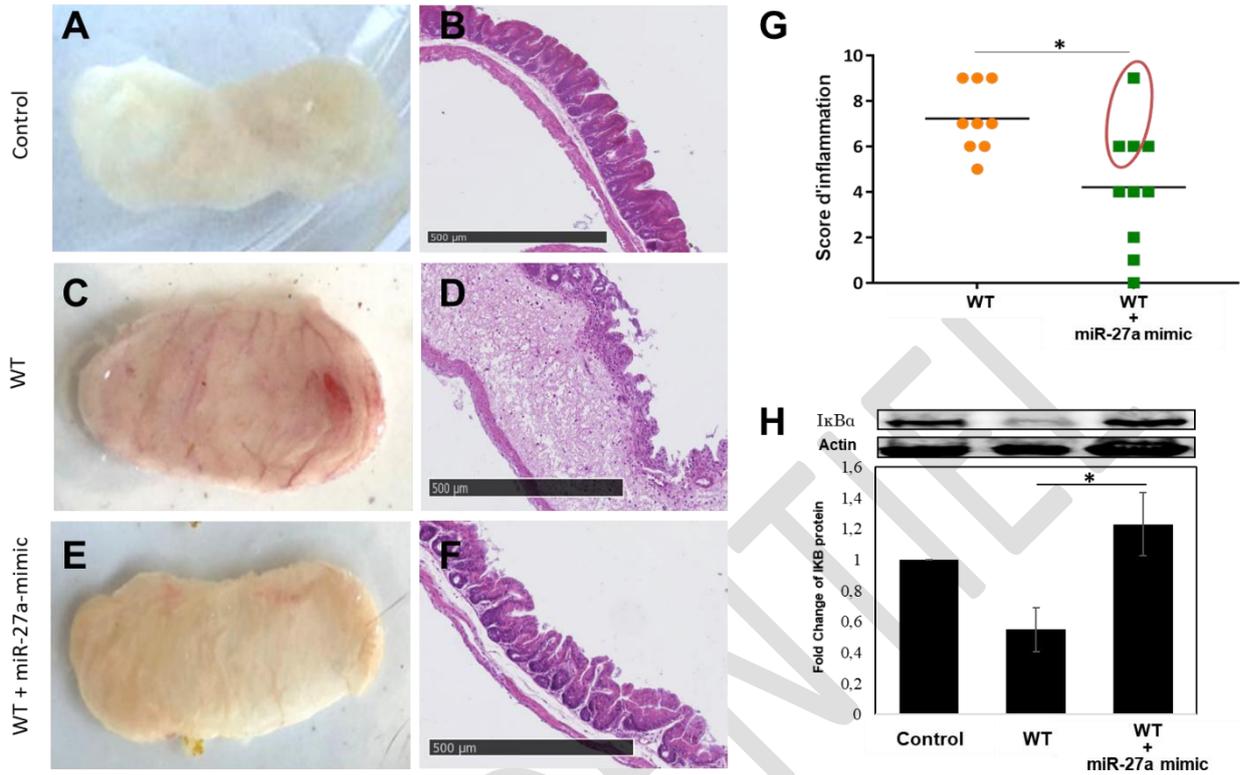
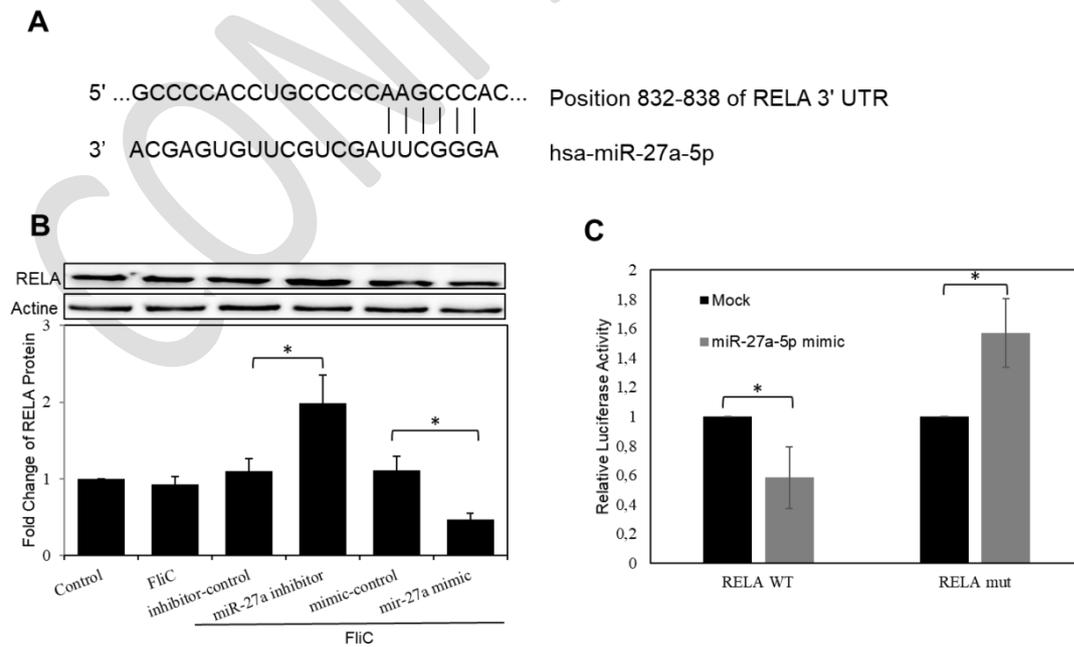


Figure 6.



Supplementary data to:

MicroRNA miR-27-5p reduces intestinal inflammation induced by *Clostridium difficile* flagella by regulating the NF- κ B signaling

Table S1. *In-silico* selected miRNAs qPCR primers.

Human miRNAs	hsa-let-7i-5p	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTG	(31)
	hsa-miR-9-5p	TCTTTGGTTATCTAGCTGTATGA	(32)
	hsa-miR-18a-5p	TAAGGTGCATCTAGTGCAGAT	(31)
	hsa-miR-19a-3p	TGTGCAAATCTATGCAAACTG	miRgator
	hsa-miR-27a-5p	AGGGCTTAGCTGCTTGTGAG	(31)
	hsa-miR-129-5p	CTTTTGCGGTCTGGGCTTG	(31)
	hsa-miR-132-5p	ACCGTGGCTTTCGATTGTTAC	(33)
	hsa-miR-147a-3p	GTGTGTGGAAATGCTTCTGC	(34)
	hsa-miR-150-5p	TCTCCAACCTTGTACCAG	Target scan
	hsa-miR-155-5p	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT	(35)
	hsa-miR-212-5p	ACCTTGGCTCTAGACTGCTTA	(31)
	hsa-miR-300-5p	TATACAAGGGCAGACTCTTC	miRgator
	hsa-miR-301a-3p	CAGTGCAATAGTATTGTCAAAGC	(36)
	hsa-miR-339-5p	TCCCTGTCCTCCAGGAGCTC	(31)
	hsa-miR-382-5p	GAAGTTGTTCTGTTGGGATTC	miRwalk
	hsa-miR-378a-5p	CTCCTGACTCCAGGTCTGT	(31)
	hsa-miR-431-5p	TGTCTTGCAGGCCGTCATGC	(31)
	hsa-miR-520a-5p	CTCCAGAGGGAAGTATTCT	miRwalk
	hsa-miR-524-5p	CTACAAAGGGAAGCACTTTCTC	miRwalk
	hsa-miR-525-5p	CTCCAGAGGGATGCACTTTC	miRwalk
hsa-miR-548d3p	TAGCAAAAAGTGCAGTACTT	miRwalk	
hsa-miR-4766-5p	TCTGAAAGAGCAGTTGGTGT	Target scan	
Reference gene	SNORD2	TCATCTTTCGGGACTGACCTG	(37)

Table S2. *In-vivo* miR-27a-5p-mimic and negative control sequences

miR-27a-5p-mimic	Guide (5'-3') AGGGCUUAGCUGCUUGUGACCCCC Passenger (5'-3') GGGGGUCACAAGCAGCUAAGCCCU
Negative control	Guide (5'-3') AAGGCAAGCUGACCCUGAAGCCCC Passenger (5'-3') GGGGGCUUCAGGGUCAGCUUGCCUU

Table S3. Inflammation score developed for the *C. difficile* infection mouse model.

1. Submucosal edema	
0	no edema
1	mild edema with minimal (< 2X) multifocal submucosal expansion
2	moderate edema with moderate (2–3X) multifocal submucosal expansion
3	severe edema with severe (> 3X) multifocal submucosal expansion
4	same as score 3 with diffuse submucosal expansion.
2. Cellular infiltration (per 400x high power field)	
0	no inflammation (0-5 cells)
1	minimal multifocal neutrophilic infiltration (6-20 cells)
2	moderate multifocal neutrophilic infiltration (greater submucosal involvement) (21-60 cells)
3	severe multifocal to coalescing neutrophilic infiltration (greater submucosal ± mural involvement) (61-100 cells)
4	same as score 3 with abscesses or extensive mural involvement (>100 cells)
3. Epithelial damage	
0	no epithelial changes
1	minimal multifocal superficial epithelial damage. Desquamation (notable shedding of epithelial cells into the lumen)
2	moderate multifocal superficial epithelial damage. Mucosal erosion (loss of epithelium with retention of architecture or gaps of 1-10 cells)
3	severe multifocal epithelial damage (same as above) +/- pseudomembrane (intraluminal neutrophils, sloughed epithelium in a fibrinous matrix). Mucosal ulceration (destruction of lamina propria or gaps of >10 cells)
4	same as score 3 with significant pseudomembrane or epithelial ulceration (focal complete loss of epithelium)
4. Loss of goblet cell (per 400X high power field)	
0	>28
1	11-28
2	1-10
3	<1

Table S4. Primers used for mRNA expression analysis by qRT-PCR

Gene	primers
hTNF- α	F'-CGAGTGACAAGCCTGTAGCC R'-GTTGACCTTGGTCTGGTAGG
hIL-8	F'-GGCACAACCTTCAGAGACAG R'-AAATTTGGGGTGGAAAGGTT
hACTIN	F'-AGAAAATCTGGCACCACACC R'-AGAGGCGTACAGGGATAGCA
mKC (IL-8)	F'-GCTGGGATTACCTCAAGAA R'-AGGTGCCATCAGAGCAGTCT
mGAPDH	F'- GAACTGGCAGAAGAGGCACT R'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT

h= human; m= mouse

CONFIDENTIAL

CONFIDENTIEL

DISCUSSION GENERALE

CONFIDENTIAL

CONFIDENTIEL

Discussion générale

Les infections à *C. difficile* induisent une inflammation intestinale importante laquelle est responsable d'une grande partie du tableau clinique de ces infections. En effet, la présentation et l'évolution des ICD peuvent être corrélées à des marqueurs fécaux de l'inflammation et non pas à des marqueurs de l'infection bactériennes. Une illustration de ce fait est l'étude prospective d'El Feghaly *et al.* sur 120 patients hospitalisés et infectés par *C. difficile* dans laquelle 62 % des patients ont développé une diarrhée persistante durant plus de cinq jours après le début du traitement par la vancomycine ou le métronidazole (48). Chez ces patients, la charge bactérienne fécale a certes diminué avec l'antibiothérapie mais n'a jamais été corrélée à la sévérité de la maladie. En revanche, la quantité fécale de l'ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-8 et CXCL5, ainsi que la présence de l'IL-8, a été fortement corrélée à la persistance et la sévérité de la maladie. Les auteurs suggèrent alors que la modulation de la réponse de l'hôte, en plus de la diminution de la charge bactérienne, pourrait constituer une approche plus efficace pour traiter les patients avec une maladie persistante. En effet, les colites pseudomembraneuses induites par l'ICD sont dues à une forte accumulation des polynucléaires neutrophiles et d'autres cellules immunitaires infiltrées de la circulation périphérique, en plus des débris cellulaires nécrotiques, de la fibrine et du mucus (197). Ces infiltrats inflammatoires sont principalement recrutés par la production intense de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, lesquelles sont produites après l'activation intracellulaire des différentes voies de signalisation pro-inflammatoires.

Plusieurs facteurs ou composants bactériens ont été décrits comme étant capables d'induire une réponse pro-inflammatoire après une interaction précoce avec les cellules épithéliales intestinales. C'est le cas particulier des toxines TcdA et TcdB de *C. difficile* qui ont été longtemps considérées comme les seuls facteurs de virulence responsables des lésions intestinales observées lors des ICD (197). Cependant, il a été rapporté récemment que des souches du ribotype 027 isolées des patients infectés par *C. difficile*, et ne produisant que de faibles quantités de toxines (sous le seuil de détection de la méthode de diagnostic par EIA) sont capables d'induire une ICD de même sévérité et avec le même niveau de lésions coliques que les souches qui produisent des quantités plus importantes de toxines, et ce malgré une capacité de colonisation identique observée entre ces deux types de souches (842). Au cours de ces dernières années, plusieurs études ont démontré un impact significatif des facteurs autres que les toxines sur la pathogénicité, suggérant que l'intoxication des cellules de l'hôte à elle seule n'est pas suffisante à expliquer les lésions tissulaires observées lors de l'infection (462).

Les flagelles bactériens peuvent être impliqués dans le développement d'une réponse inflammatoire délétère au niveau des muqueuses (843). Récemment, le rôle du flagelle de *C. difficile* dans les lésions intestinales a été étudié. La première preuve d'une possible action conjointe des toxines et des flagelles de *C. difficile* sur le processus inflammatoire intestinal a été rapportée par Yoshino *et al.* (224). Notre équipe a ensuite montré que la flagelline de *C. difficile* active principalement la voie pro-inflammatoire de NF- κ B avec comme conséquence la production de cytokines pro-inflammatoires, particulièrement l'IL-8, l'IL-6 et MCP-1 suggérant fortement le rôle prépondérant de cette cascade de signalisation centrale suite à l'interaction TLR5-FliC de *C. difficile* (465).

Alors que le rôle spécifique des toxines TcdA et TcdB dans la réponse inflammatoire a fait l'objet d'études *in vivo* préalables dans le contexte de bactéries flagellées, la coopération entre les toxines et les autres composants bactériens dans l'induction de l'inflammation n'a jamais été démontrée *in vivo*. Dans notre travail, nous montrons pour la première fois, dans un modèle murin d'ICD, que l'action des toxines à elle seule, sans la flagelline, n'est pas suffisante à provoquer le niveau important de lésions épithéliales intestinales observées chez les souris infectées. Ainsi, quelle que soit la souche utilisée pour l'infection des souris, R20291 ou 630 Δ erm, et malgré une sévérité plus importante de l'infection provoquée par la souche épidémique R20291, probablement liée à un degré différent d'expression des toxines *in vivo*, la présence des toxines TcdA et TcdB n'a pas suffi à elle seule à entraîner les manifestations cliniques et les lésions observées dans ce modèle murin. Par ailleurs, malgré la différence quant au rôle des flagelles dans l'adhésion et la colonisation dans des modèles *in vitro* et *in vivo* observée entre les souches R20291 et 630 Δ erm de *C. difficile* (326), nos travaux montrent que les flagelles de ces deux souches possèdent la même capacité d'induction d'une réponse inflammatoire chez l'hôte. Une façon de confirmer ce rôle similaire de la flagelline des deux souches dans l'induction de la réponse inflammatoire serait d'étudier le rôle de FliC de la souche 630 Δ erm dans le fond génétique de la souche R20291 *in vivo*, en introduisant le gène *fliC*-630 Δ erm dans le mutant *fliC*-R20291. Les flagelles semblent alors jouer un rôle essentiel dans l'induction et l'amplification de la réponse inflammatoire intestinale. Cela a été confirmé par l'absence de manifestations cliniques de l'ICD chez les souris n'exprimant pas le TLR5 (KO *tlr5*^{-/-}) et infectées par la souche R20291, suggérant que la réponse inflammatoire observée chez la souris implique une interaction TLR5-flagelline avec pour conséquence l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires.

Nous avons analysé également l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires dans l'intestin et montré une corrélation avec les résultats cliniques et histologiques. En effet, même si une activation des voies de signalisation de NF- κ B et des MAPK a été observée chez les souris

infectées par la souche sauvage R20291, la voie de NF- κ B n'a pas été activée chez les souris infectées par le mutant FliC- R20291, suggérant encore une fois le rôle des flagelles dans l'activation de cette voie pivot de l'inflammation.

Nos résultats vont alors dans le même sens que l'hypothèse émise selon laquelle il existerait une coopération entre les toxines et les flagelles dans la pathogenèse de *C. difficile* : les toxines, par leur action sur le cytosquelette cellulaire, vont perturber la barrière épithéliale intestinale par altération des jonctions serrées permettant à la flagelline d'accéder aux récepteurs TLR5 localisés au pôle basolatéral des cellules épithéliales, favorisant ainsi le développement d'une réponse pro-inflammatoire intestinale. Ce rôle des flagelles et des toxines de *C. difficile* démontré dans le modèle murin d'ICD reste à confirmer chez l'homme. En effet, des différences existent entre les caecums murin et humain quant à la composition du microbiote et probablement quant à la distribution des sous-populations de cellules immunitaires (844). Ces différences pourraient rendre compte d'une réponse de l'hôte différente entre la souris et l'homme. Cependant, les caecums murin et humain présentent des ressemblances anatomiques et histologiques, et constituent le réservoir hébergeant la plus grande variété d'espèces microbiennes du microbiote intestinal (844). Par ailleurs *C. difficile* colonise principalement cette partie de l'intestin aussi bien chez la souris que chez l'homme, même si chez ce dernier tout le gros intestin peut être atteint lors des ICD, ce qui n'est pas le cas chez la souris, où les lésions sont localisées principalement dans le caecum. Ces ressemblances rapprocheraient le modèle murin d'ICD de l'infection chez l'homme et permettent d'extrapoler, tout au moins partiellement, la physiopathologie de l'ICD chez l'homme à partir des données chez la souris.

Ainsi, jusqu'à présent, il était admis que seules les toxines TcdA et TcdB étaient responsables des lésions de la muqueuse colique observées au cours de l'infection à *C. difficile*. Or, l'ensemble de nos travaux montrent que, même si la présence des toxines est nécessaire à l'altération de l'épithélium muqueux, les flagelles de la bactérie contribuent à la dérégulation de la réponse innée par le biais de la stimulation des TLRs exposées au pathogène durant l'infection. Cet aspect constitue l'un des aspects les plus originaux de notre travail et apporte de nouveaux éléments à la compréhension de la physiopathologie de l'ICD. Par ailleurs, ces données renforcent le fait que la flagelline bactérienne pourrait constituer un bon immunogène pour l'induction d'une réponse immunitaire protectrice contre des pathogènes intestinaux et elles ouvrent la voie à d'autres approches vaccinales en complément des approches utilisant les toxines TcdA ou TcdB comme seuls immunogènes et dont l'efficacité en termes de protection s'est révélée jusqu'à présent incomplète.

Dans le contexte de l'ICD, les flagelles bactériens à proximité de l'épithélium muqueux vont, par la stimulation du TLR5 et par leur rôle pro-inflammatoire, lever le phénomène de tolérance et d'homéostasie muqueuse, amplifiant par là même la réponse innée de l'hôte. Cette réponse dépassera probablement le but principal de clairance du pathogène et provoquera des effets délétères au niveau de la muqueuse concernée. C'est sur cet aspect que nous nous sommes focalisés dans la deuxième partie de cette thèse, où nous avons tenté de disséquer les mécanismes de régulation de

Cette réponse inflammatoire de l'hôte induite par *C. difficile*. En effet, l'activation de la réponse immunitaire innée via les voies de signalisation dépendantes des récepteurs TLRs est nécessaire à l'élimination des agents pathogènes. Or une activation excessive de ces voies pourrait perturber l'homéostasie cellulaire et immunitaire et provoquer des lésions tissulaires. Ce processus inflammatoire délétère est à l'origine d'une grande partie des manifestations cliniques observées lors des ICD, et plus particulièrement des formes modérées et sévères de l'infection, comme dans les cas des colites pseudomembraneuses, du mégacôlon toxique, de la colite fulminante ou de la perforation colique. Ainsi, ces complications inflammatoires peuvent même favoriser la mort, en particulier chez des patients fragiles et à risque. De ce fait, il est tout à fait légitime d'envisager, en parallèle d'un traitement antibiotique efficace, le contrôle de la réponse inflammatoire intestinale afin de limiter l'intensité des lésions intestinales ainsi que l'incidence des formes graves de l'infection et de permettre un rétablissement plus efficace et plus rapide des patients. Les effecteurs des voies de signalisation de NF- κ B sont relativement bien connus et pourraient constituer des cibles directes pour le contrôle de cette voie de signalisation. Néanmoins, la spécificité de ce type de ciblage peut s'avérer délicate de par le fait que ces effecteurs sont souvent pléiotropes et très ubiquitaires dans les différents tissus. Nous avons alors tenté de rechercher d'autres mécanismes de régulation plus spécifiques de la voie NF- κ B dans le contexte de l'inflammation intestinale.

Nous avons observé dans nos études *in vivo* du rôle des flagelles, discutées plus haut, une augmentation de l'expression des gènes de l'inflammation activée par la voie NF- κ B, mais également une diminution consécutive de l'expression d'autres gènes, dont celui codant le récepteur TLR5 lui-même, suggérant la présence d'une régulation négative de ces gènes induite par les flagelles eux-mêmes. Parmi les mécanismes de régulation des voies de signalisation des TLRs, nous nous sommes particulièrement intéressés aux microARN, responsables de la régulation post-transcriptionnelle des gènes. Ces ARN non codant jouent un rôle important dans la modulation des voies de signalisation des TLRs (voir Chapitre IV.7.2 miARN et voies de signalisation des récepteurs TLRs), et agissent dans la régulation de l'expression des gènes des effecteurs et des

régulateurs de signalisation des TLRs, des facteurs de transcription ainsi que des gènes codant les cytokines (741). A ce jour, malgré le nombre important de publications établissant le lien entre les miARN et une grande variété de pathologies, une seule étude a fait le lien entre les ICD et les miARN. Dans cette publication, il est rapporté que le miR-146b est surexprimé dans le côlon des souris infectées par *C. difficile* et que l'activation du miR-146b et de PPAR γ est impliquée dans la régulation de la réponse des lymphocytes Th17 dans les colites induites par *C. difficile* chez la souris (845).

Afin d'étudier l'expression des miARN associés à la réponse inflammatoire induite par la flagelline de *C. difficile*, nous avons débuté notre étude par le criblage des miARN régulés par les flagelles au cours des ICD. Nous avons réalisé une sélection de miARN répertoriés dans les banques de données en nous appuyant sur des données publiées montrant, d'une part, un lien entre un miARN donné et un effecteur ou une protéine de signalisation commune aux voies des TLRs (tel que le complexe IRAK-TRAF ou le facteur NF- κ B) ou, d'autre part, une variation de l'expression d'un miARN en réponse à la flagelline bactérienne. La sélection a également été basée sur des banques de données (TargetScan, miRgator et miRWalk) spécifiques des miARN, utilisant des algorithmes permettant de prédire leurs cibles par la recherche d'une homologie structurale entre la région 3'UTR de l'ARNm cible (le TLR5 dans notre cas) et les différents miARN. Un criblage plus large aurait pu être effectué, par la technique de RNA-seq par exemple ; cependant, compte tenu du grand nombre de miARN humains l'interprétation des résultats pourrait s'avérer complexe avec la détection des miARN pas nécessairement impliqués dans le processus inflammatoire (faux-positifs). Nous avons alors décidé d'adopter cette approche de criblage restreint pour mieux cibler la régulation des voies de signalisation pro-inflammatoires impliquées dans la réponse de l'hôte associée aux flagelles.

Parmi 113 miARN dont l'expression a été analysée *in vitro*, sur une cinétique de 12 h, 4 miARN ont présenté une variation d'expression (plus de 2 fois) après stimulation des cellules Caco-2 par la flagelline recombinante FliC de *C. difficile* : les miR-27a-5p, miR-146a-5p, miR-222-5p et miR-21-3p. Par ailleurs, ces 4 miARN ont présenté des cinétiques d'expression différentes et ont été également surexprimés dans les cellules infectées par la souche R20291 de *C. difficile*, contrairement aux cellules infectées par le mutant isogénéique non flagellé, suggérant ainsi une surexpression induite spécifiquement par la flagelline de *C. difficile*. Cette surexpression spécifique de ces miARN induite par la flagelline a été également observée *in vivo* dans le modèle murin d'ICD. Ainsi, ces 4 miARN ont été surexprimés dans le caecum des souris infectées par la souche R20291 sauvage mais pas dans le caecum des souris infectées par le mutant non flagellé, ni dans le caecum des souris KO *tlr5*^{-/-} infectées par la souche R20291 sauvage de *C. difficile*. Bien que nous

soyons particulièrement intéressés à la régulation de la voie de signalisation activée par l'interaction FliC-TLR5, l'étude de l'induction de l'expression de ces miARN par la bactérie entière était nécessaire pour confirmer que cette expression n'est pas inhibée par d'autres composants bactériens ou qu'elle résulte d'un artéfact expérimental.

La détection d'une régulation pour seulement 4 des 113 miARN étudiés peut sembler relativement faible, mais il est intéressant de noter qu'à l'heure actuelle les rapports de la littérature font mention de seulement 1 ou 2 miARN identifiés comme étant spécifiques d'une pathologie particulière. Par exemple, le miR-155 semble être impliqué dans la polyarthrite rhumatoïde pour son rôle pro-inflammatoire (846). Ce miARN est surexprimé dans les macrophages de la membrane et du liquide synovial chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et cible la protéine SHIP-1 (*Src homology 2-containing inositol phosphatase-1*), régulatrice négative de l'inflammation. Ainsi, les souris déficientes pour le miR-155 deviennent résistantes à la polyarthrite induite par le collagène. D'autre part, le miR-326 est impliqué dans la sévérité de la sclérose en plaques pour son rôle dans la voie de développement des lymphocytes Th17 de la réponse immunitaire (847). Ce miARN cible un régulateur négatif de la différenciation des cellules Th17 (*Ets-1*) et son inhibition *in vivo*, chez la souris, permet la diminution de la production des cellules Th-17 et la réduction de la sévérité de la pathologie.

Nous avons étudié l'impact de l'inhibition des voies de signalisation de NF- κ B et des MAPKs, afin de déterminer celles qui induisent les 4 miARN identifiés. Nous avons ainsi observé une très forte inhibition de l'expression du miR-27a-5p dans les cellules stimulées par FliC ou par la souche R20291 et préalablement incubées avec un inhibiteur chimique de la voie de signalisation de NF- κ B. Ceci suggère que le miR-27a-5p est induit par l'activation de la voie de NF- κ B. Ce fort degré d'inhibition de l'expression du miR-27a-5p n'a pas pu être observé lors de l'inhibition spécifique des voies des MAPKs ; par ailleurs, l'expression des trois autres miARN a été moins affectée que celle du miR-27a-5p dans les différentes conditions testées. Le niveau élevé d'inhibition du miR-27a-5p nous a conduit à poursuivre notre étude en nous focalisant sur le rôle *in vivo* et *in vitro* du miR-27a-5p dans l'inflammation intestinale associée à l'ICD. L'utilisation des molécules inhibant (anti-miR-27a-5p) ou mimant l'activité (miR-27a-5p-mimic) du miR-27a-5p a permis d'identifier un rôle anti-inflammatoire de ce miARN dans le modèle de cellules épithéliales intestinales Caco-2 stimulées par la flagelline FliC de *C. difficile*. En effet, le miR-27a-5p-mimic induit une nette diminution de l'activation de la voie de NF- κ B et de l'expression de gènes des cytokines pro-inflammatoires IL-8 et TNF α , ainsi que la production de l'IL-8 dans le surnageant de culture des cellules, alors que l'anti-miR-27a-5p induit l'effet totalement opposé. L'activité anti-inflammatoire du miR-27a-5p suggère que ce miARN pourrait participer à une boucle de rétrocontrôle

négatif dans laquelle l'activation de la voie pro-inflammatoire de NF- κ B, suite à l'interaction TLR5-FliC, induirait une surexpression du miR-27a-5p qui exercerait en retour une activité anti-inflammatoire, en agissant à différents niveaux possibles de la voie de NF- κ B elle-même. Le rôle du miR-27a-5p dans la régulation des voies des MAPKs n'a pas été étudié dans ce travail de recherche, il serait alors intéressant d'étudier également l'impact du miR-27a-5p sur ces voies de signalisation, bien que l'impact observé de l'inhibition de ces voies sur ce miARN soit moindre. De plus, le rôle des trois autres miARN miR-146a-5p, miR-222-5p et miR-21-3p dans la régulation de la réponse pro-inflammatoire associée à l'ICD reste à déterminer. Ces trois miARN ont été décrits comme étant impliqués dans la régulation de la signalisation inflammatoire ainsi que dans d'autres processus pathologiques. Par exemple, le miR-146a possède une activité anti-inflammatoire dans des tissus rénaux de patients atteints de néphrite lupique en inhibant la signalisation de NF- κ B et la synthèse des IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α par le biais de la régulation de l'expression de la protéine TRAF6 (848). En revanche, un rôle pro-inflammatoire a été également montré pour ce miARN, comme dans un modèle *in vitro* de sepsis dans lequel le miR-146a augmente l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans des cellules endothéliales du cordon ombilical (*human umbilical vein endothelial cells, HUVEC*) ou des vaisseaux pulmonaires (*human pulmonary microvascular endothelial cells, HPMEC*) (849). Quant au miR-21, c'est l'un des miARN les plus fréquemment régulés dans les tumeurs solides et il est connu pour être un miARN oncogénique (850). Un rôle anti-inflammatoire du miR-21 a été également décrit dans la régulation négative de la signalisation TLR4-NF- κ B notamment dans les macrophages (851). Enfin, le miR-222 est également impliqué dans le cancer dans des processus physiologiques du système cardiovasculaire. Dans le muscle cardiaque par exemple, le miR-222 pourrait favoriser la croissance, la prolifération et la survie des cardiomyocytes en ciblant directement P27, HIPK-1, HIPK-2 et CITED-4 dans la voie de l'exercice traditionnel (852). Le rôle de ce miARN dans l'inflammation n'est pas bien élucidé.

L'activité anti-inflammatoire du miR-27a-5p observée *in vitro* nous a permis d'émettre l'hypothèse qu'un analogue synthétique de ce miARN (miR-27a-5p-mimic) pourrait réduire l'inflammation intestinale observée lors d'une ICD *in vivo*. Nous avons alors traité des souris infectées par la souche R20291 de *C. difficile* par une formulation du miR-27a-5p-mimic par voie IV. Toutes les souris infectées et non traitées par ce miARN mimic ont développé une ICD avec une inflammation intestinale importante et un taux de mortalité de 19 % a été observé. En revanche, 70 % des souris infectées et traitées par le miR-27a-mimic n'ont présenté aucun signe de la maladie ; les autres souris (30 %) n'ont développé qu'une diarrhée simple sans ou avec peu d'inflammation intestinale et aucune mortalité n'a été observée dans ce groupe d'animaux. Les analyses anatomopathologiques, transcriptomiques et protéiques sur des marqueurs d'inflammation de la

voie pro-inflammatoire de NF- κ B ont confirmé la réduction de la réponse inflammatoire intestinale. Ces résultats apportent la preuve du concept du rôle important du miR-27a-5p dans le contrôle de la réponse pro-inflammatoire intestinale induite par l'ICD, et ouvrent la voie à l'utilisation de ce miARN, en association à une antibiothérapie efficace, dans le traitement des formes modérés à sévères des ICD. En réduisant l'activation de la voie de signalisation de NF- κ B et en mimant l'activité anti-inflammatoire du miR-27a-5p naturel dans la boucle de rétrocontrôle négatif, cette molécule pourrait contrôler les boucles continues d'activation de cette voie pro-inflammatoire.

Il a été montré que, les flagelles bactériens étant des PAMPs, ils induisent l'expression des miARN y compris du miR-27a-5p, dans plusieurs types de cellules (803). Ainsi, ce miR-27a-5p a été décrit comme étant impliqué dans la régulation de différents processus pathologiques. Par exemple, le miR-27a-5p est inhibé dans des tissus de cancer du poumon à petites cellules, et sa surexpression inhibe l'agressivité des cellules cancéreuses (853). Le miR-27a-5p aurait également un rôle suppressif de tumeurs pendant les phases précoces de la carcinogenèse de la prostate (854). En revanche, ce même miARN pourrait avoir un rôle oncogénique dans d'autres types de cancer, comme le cancer du sein (855). Cet aspect devra être pris en compte dans l'éventuel projet de développement de ce miARN pour une approche thérapeutique de l'inflammation.

Le rôle anti-inflammatoire du miR-27a-5p a été décrit dans d'autres tissus que l'épithélium intestinal. Par exemple, le miR-27a-5p est impliqué dans la régulation de la réponse inflammatoire des cellules endothéliales aortique humaines (HAEC), via la voie NF- κ B, en réponse à des glycérophospholipides oxidizés et à l'IL-1B (856). De même, l'expression du miR-27a-5p est diminuée dans les cellules interstitielles de la valve mitrale en réponse au TNF α , et un miR-27a-5p-mimic cible la voie de signalisation de JNK et β -caténine et protège les cellules interstitielles des dommages cellulaires induites par le TNF α (857). Il a été également observé qu'un miR-27a-5p-mimic atténue les dommages inflammatoires induits par l'ischémie-reperfusion de la barrière hémato-encéphalique en inhibant la voie NF- κ B / IL-1 β (858). En revanche, le miR-27a pourrait jouer un rôle pro-inflammatoire dans des macrophages stimulés en régulant l'expression de l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire (859). Par ailleurs, le rôle des miARN (mais pas du miR-27a-5p) a été largement étudié dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : ainsi, un grand nombre de miARN pourrait présenter un rôle anti- ou pro-inflammatoires dans le contexte de ces maladies (860).

Compte tenu des fonctions biologiques diverses du miR-27a-5p, la question de la toxicité potentielle et de la spécificité de ce miARN s'impose. Il s'avère donc nécessaire d'identifier la cible

cellulaire directe du miR-27a-5p afin de mieux caractériser son mécanisme d'action. Plusieurs cibles du miR-27a-5p dans la voie de signalisation de NF- κ B ont été décrites dans la littérature. Par exemple, la protéine TAB3 qui participe à l'activation de la voie de signalisation de NF- κ B a été décrite comme une cible du miR-27a-5p dans le foie des souris atteintes de sepsis et traitées par le Paclitaxel (861). Dans une autre étude, la protéine TICAM-2 (un adaptateur de la voie TLR4) a été identifiée comme cible du miR-27a dans la barrière hémato-encéphalique des rats (858). Romay *et al.* ont montré que le miR-27a-5p pourrait cibler une 22 protéines différentes sélectionnées *in silico* sur la base de la présence dans la région 3'-UTR de leur ARN de sites de liaison à ce miARN (prédits par la base de données miRANDA) par la technique du gène rapporteur. Parmi ces cibles, on trouve des activateurs de la voie de signalisation de NF- κ B comme la protéine MAP2K7 ou des inhibiteurs de cette même voie dont les protéines TNFAIP3 et TNIP1 (856). Cette diversité de cibles pour un même miARN pourrait expliquer les rôles différents du miR-27a-5p mentionnés dans le paragraphe précédent. A ce jour, le mécanisme par lequel un miARN donné régule préférentiellement une cible donnée sans les autres cibles prédites n'a toujours pas été bien élucidé. Cependant l'environnement et les conditions cellulaires, les stimuli ainsi que le type cellulaire/tissulaire pourraient constituer des facteurs déterminant le rôle d'un miARN ainsi que sa cible principale dans ces conditions. Au cours de notre travail, nous avons identifié RelA (composant du complexe protéique NF- κ B) comme cible potentielle du miR-27a-5p en nous basant sur une homologie de séquence et la construction d'un gène rapporteur luciférase de la région 3'-UTR de RelA (résultats non présentés). Malgré les résultats positifs obtenus, cette approche reste une approche artificielle qui pourrait générer des résultats faux-positifs. Des techniques qui permettent l'identification directe des cibles des miARN endogènes existent et seront envisagées pour l'identification de la ou les cibles du miR-27a-5p.

L'effet anti-inflammatoire du miR-27a-5p-mimic étudié dans ce travail de thèse pourrait conduire au développement à moyen terme d'une approche thérapeutique novatrice ciblant spécifiquement la voie de signalisation pro-inflammatoire TLR5-NF- κ B induite par *C. difficile*, afin de réduire la réponse délétère de l'hôte, responsable des lésions tissulaires et des manifestations cliniques sévères. Par ailleurs, dans le cas d'autres maladies inflammatoires sévères de l'intestin comme la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, cette approche thérapeutique pourrait s'avérer être très utile et représenter une véritable alternative aux médicaments anti-inflammatoires comme les corticoïdes ou les biothérapies (anticorps monoclonaux anti TNF- α entre autres) dont les effets indésirables à moyen et long terme sont considérables voire mortels (risques de surinfection graves, développement de cancers, etc.).

CONFIDENTIEL

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONFIDENTIEL

Conclusion et perspectives

Le traitement actuel des infections à *Clostridium difficile* est uniquement basé sur l'utilisation d'antibiotiques (vancomycine, métronidazole). Les patients atteints d'ICD en milieu hospitalier et développant des formes modérées à sévères de l'infection pourraient bénéficier d'une approche thérapeutique ciblant spécifiquement la forte réponse inflammatoire intestinale. La sévérité de l'infection est la conséquence d'une forte réponse inflammatoire, laquelle n'est pas contrôlée par les antibiotiques, et est à l'origine de l'allongement de la durée de séjour et des coûts élevés de l'infection. D'autre part, les traitements standards des maladies inflammatoires chroniques que sont les corticostéroïdes, les immunosuppresseurs et des anti-TNF- α sont lourds et présentent de nombreux effets secondaires. La proposition d'une nouvelle approche thérapeutique ciblant l'inflammation localisée au niveau des cellules épithéliales intestinales, via la modulation de la voie NF- α B par un microARN, paraît donc pertinente. Les miARN constituent une nouvelle classe d'outils thérapeutiques qui commencent tout juste à arriver sur le marché ; en effet, le premier médicament à base d'ARN, développé par Anylam pharmaceuticals, a obtenu son autorisation de mise sur le marché (AMM) aux États-Unis et en Europe en août 2018. Le développement de ce type de médicament, soutenu par des *start-ups* ou des sociétés de biotechnologies, pour des maladies inflammatoires apparaît comme une voie novatrice et prometteuse du développement pharmaceutique.

L'effet anti-inflammatoire du mir-27a-5p-mimic dans les ICD fait actuellement une demande de dépôt d'un brevet. Ainsi, nos résultats nous ont permis d'obtenir un financement auprès de la SATT Paris-Saclay afin de valoriser nos travaux. Un programme de développement à moyen et long terme a été ainsi proposé. L'objectif principal de ce programme est l'obtention d'un produit candidat médicament prêt à entrer en phase préclinique réglementaire. Étant donné que nous avons obtenu la preuve de concept sur l'efficacité du miR-27a-mimic dans la régulation de l'inflammation intestinale associée aux ICD (dans un modèle murin), l'identification et la validation de la cible semblent nécessaires pour comprendre par la suite le mécanisme d'action du miR-27a-5p. Cette tâche est alors envisagée pour un programme de pré-maturation, dans un premier temps. Nous envisageons alors d'identifier la cible cellulaire principalement grâce à une technique nommée TargetLink, dont la mise au point a été initiée au laboratoire). Cette technique consiste à co-précipiter le miR-27a-5p endogène lié à son ARNm cible après « cross linking » par rayons UV. Une deuxième approche protéique pourrait être envisagée en parallèle pour superposer les résultats. Une fois la cible identifiée, la deuxième partie du travail sera consacrée à sa validation *in vitro* dans le modèle de cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2 et *in vivo* dans le modèle

murin d'ICD, par l'étude transcriptomique et protéique. L'expression du miR-27a-5p et de sa cible sera également étudiée dans des biopsies humaines des patients infectés par *C. difficile*. L'utilisation de siRNAs pour la validation de la ou les cibles est également envisagée. Cette technique nous permettra d'identifier, dans le cas où le miR-27a-5p posséderait plusieurs cibles, l'ARNm principalement ciblé par le miARN et celui dont l'inhibition a le plus grand impact dans l'effet observé sur la modulation de la réponse inflammatoire. En fonction des résultats, un changement de l'objet thérapeutique pourrait alors être envisagé plus tard durant la « maturation », par un switch miARN en siRNA, qui présenterait une complémentarité parfaite avec la cible et donc une spécificité améliorée. L'étude de l'infection chez des souris KO pour la ou les cibles identifiées (selon leur disponibilité) pourrait être envisagée pour compléter l'étude et valider la cible identifiée. En parallèle de ces travaux, des études de l'effet dose seront effectuées pour déterminer la puissance et l'efficacité maximale du candidat médicament. Sous réserve des résultats positifs, ce travail sera poursuivi dans le cadre d'une maturation où nous étudierons la pharmacocinétique, la biodistribution, la formulation et la voie d'administration du candidat médicament, qui dépendront à leur tour des résultats obtenus en pré-maturation. Des études préliminaires de toxicité seront également réalisées.

Les résultats de nos études apportent donc la preuve du concept pour une nouvelle approche thérapeutique ciblant l'inflammation intestinale au cours des ICD en complément de l'antibiothérapie.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

CONFIDENTIEL

Références bibliographiques

1. Hall IC, O'toole E. Intestinal flora in new-born infants: With a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. Am J Dis Child. 1 févr 1935;49(2):390-402.
2. Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ. *Clostridium difficile* infection. Nat Rev Dis Primer. 07 2016;2:16020.
3. Snyder ML. Further Studies on *Bacillus Difficilis* (Hall and O'Toole). J Infect Dis. 1 mars 1937;60(2):223-31.
4. Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA, éditeurs. Approved Lists of Bacterial Names (Amended). Washington (DC): ASM Press; 1989.
5. Danielsson D, Lambe DW, Persson S. The Immune Response In a Patient To an Infection With *Bacteroides fragilis* SS. *fragilis* And *Clostridium difficile*. Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol. 80B(5):709-12.
6. George WL, Sutter VL, Finegold SM. Antimicrobial agent-induced diarrhea : a bacterial disease. J Infect Dis. 1977;136(6):822-8.
7. Finney JM. Gastroenterostomy for cicatrizing ulcer of pylorus. Bull Johns Hopkins Hosp. 1983;4:53.
8. Moss. Handbook of Natural Toxins, Volume 8: Bacterial Toxins and Virulence Factors in Disease. CRC Press; 1995. 656 p.
9. George RH, Symonds JM, Dimock F, Brown JD, Arabi Y, Shinagawa N, et al. Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. Br Med J. 18 mars 1978;1(6114):695.
10. George WL, Sutter VL, Goldstein EJ, Ludwig SL, Finegold SM. Aetiology of antimicrobial-agent-associated colitis. Lancet Lond Engl. 15 avr 1978;1(8068):802-3.
11. Larson HE, Price AB, Honour P, Borriello SP. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. Lancet Lond Engl. 20 mai 1978;1(8073):1063-6.
12. Keighley MR, Burdon DW, Arabi Y, Williams JA, Thompson H, Youngs D, et al. Randomised controlled trial of vancomycin for pseudomembranous colitis and postoperative diarrhoea. Br Med J. 16 déc 1978;2(6153):1667-9.
13. V Riley T. *Clostridium difficile*: A pathogen of the nineties. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 17^e éd. 1998;137-41.
14. Cloud J, Kelly CP. Update on *Clostridium difficile* associated disease. Curr Opin Gastroenterol. janv 2007;23(1):4-9.
15. Barbut F, Jones G, Eckert C. Epidemiology and control of *Clostridium difficile* infections in healthcare settings: an update. Curr Opin Infect Dis. août 2011;24(4):370-6.

16. Hensgens MPM, Keessen EC, Squire MM, Riley TV, Koene MGJ, de Boer E, et al. *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. juill 2012;18(7):635-45.
17. Le Monnier A, Zahar J-R, Barbut F. Update on *Clostridium difficile* infections. Med Mal Infect. août 2014;44(8):354-65.
18. Yutin N, Galperin MY. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced *Clostridia*. Environ Microbiol. oct 2013;15(10):2631-41.
19. Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. Anaerobe. août 2016;40:95-9.
20. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Kazakova SV, Sambol SP, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. N Engl J Med. 8 déc 2005;353(23):2433-41.
21. McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. Emerg Infect Dis. mars 2006;12(3):409-15.
22. Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, Beldavs ZG, Dumyati GK, Dunn JR, et al. Burden of *Clostridium difficile* Infection in the United States. N Engl J Med. 26 févr 2015;372(9):825-34.
23. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care-Associated Infections. N Engl J Med. 27 mars 2014;370(13):1198-208.
24. Gravel Denis MM. *Clostridium difficile* Associated Diarrhea in Acute-Care Hospitals Participating in CNISP: November 1, 2004 to April 30, 2005 [Internet]. 2007. Disponible sur: http://www.phac-aspc.gc.ca/nois-sinp/pdf/c-difficile_cnisp-pcsin-eng.pdf
25. Pépin J, Valiquette L, Alary M-E, Villemure P, Pelletier A, Forget K, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. CMAJ Can Med Assoc J. 31 août 2004;171(5):466-72.
26. Barbut F, Delmée M, Brazier JS, Petit JC, Poxton IR, Rupnik M, et al. A European survey of diagnostic methods and testing protocols for *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect. 1 oct 2003;9(10):989-96.
27. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BHB, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet. 1 janv 2011;377(9759):63-73.
28. Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. Clin Microbiol Infect. 1 nov 2007;13(11):1048-57.
29. Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, Barbut F, Barna Z, et al. Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). Lancet Infect Dis. 1 déc 2014;14(12):1208-19.

30. European Centre for Disease Prevention and Control. *Clostridium difficile* infections - Annual Epidemiological Report for 2016 [Internet]. 2018 [cité 10 juill 2018]. Disponible sur: <http://ecdc.europa.eu/en/publications-data/clostridium-difficile-infections-annual-epidemiological-report-2016>
31. Thiolet, J. M., I. Pujol, C. Bernet, A. Carbonne, A. Dumartin, I. Raclot, H. Sénéchal, L. Signalements externes des infections nosocomiales, France, 2006. Bull Epidemiol Hebd. 2008;30-31:265-8.
32. Tachon M, Cattoen C, Blanckaert K, Pujol I, Carbonne A, Barbut F, et al. First cluster of *C. difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 027 associated disease in France: preliminary report, Eurosurveillance Weekly 11. 2006. Report No.: E060501.1.
33. Coignard B, Barbut F, Blanckaert K, Thiolet J-M, Carbonne A, Pujol I, et al. Actualité des infections digestives à *Clostridium difficile*, France, 2007. Rev Francoph Lab. nov 2007;2007(396):41-8.
34. Eckert C, Coignard B, Hebert M, Tarnaud C, Tessier C, Lemire A, et al. Clinical and microbiological features of *Clostridium difficile* infections in France: the ICD-RAISIN 2009 national survey. Med Mal Infect. févr 2013;43(2):67-74.
35. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Severe *Clostridium difficile*-associated disease in populations previously at low risk--four states, 2005. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2 déc 2005;54(47):1201-5.
36. Kim J, Smathers SA, Prasad P, Leckerman KH, Coffin S, Zaoutis T. Epidemiological features of *Clostridium difficile*-associated disease among inpatients at children's hospitals in the United States, 2001-2006. Pediatrics. déc 2008;122(6):1266-70.
37. Lessa FC, Gould CV, McDonald LC. Current Status of *Clostridium difficile* Infection Epidemiology. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1 août 2012;55(Suppl 2):S65-70.
38. Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, Kammer PP, Orenstein R, St. Sauver JL, et al. The Epidemiology of Community-acquired *Clostridium difficile* infection: A population-based study. Am J Gastroenterol. janv 2012;107(1):89-95.
39. Dallal RM, Harbrecht BG, Boujoukas AJ, Sirio CA, Farkas LM, Lee KK, et al. Fulminant *Clostridium difficile*: An Underappreciated and Increasing Cause of Death and Complications. Ann Surg. mars 2002;235(3):363-72.
40. Muto CA, Pokrywka M, Shutt K, Mendelsohn AB, Nouri K, Posey K, et al. A large outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. Infect Control Hosp Epidemiol. mars 2005;26(3):273-80.
41. Oake N, Taljaard M, van Walraven C, Wilson K, Roth V, Forster AJ. The effect of hospital-acquired *Clostridium difficile* infection on in-hospital mortality. Arch Intern Med. 8 nov 2010;170(20):1804-10.
42. Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. N Engl J Med. 8 déc 2005;353(23):2442-9.

43. Hubert B, Loo VG, Bourgault A-M, Poirier L, Dascal A, Fortin E, et al. A portrait of the geographic dissemination of the *Clostridium difficile* North American pulsed-field type 1 strain and the epidemiology of *C. difficile*-associated disease in Québec. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 janv 2007;44(2):238-44.
44. Gravel D, Miller M, Simor A, Taylor G, Gardam M, McGeer A, et al. Health care-associated *Clostridium difficile* infection in adults admitted to acute care hospitals in Canada: a Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program Study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 mars 2009;48(5):568-76.
45. Pépin J, Valiquette L, Cossette B. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ Can Med Assoc J.* 25 oct 2005;173(9):1037-42.
46. National Center for Health Statistics (US). *Health, United States, 2010: With Special Feature on Death and Dying.* Hyattsville (MD): National Center for Health Statistics (US); 2011. (Health, United States).
47. Lucado J, Gould C, Elixhauser A. *Clostridium difficile* Infections (CDI) in Hospital Stays, 2009: Statistical Brief #124. In: *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs.* Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2006.
48. El Feghaly RE, Stauber JL, Deych E, Gonzalez C, Tarr PI, Haslam DB. Markers of intestinal inflammation, not bacterial burden, correlate with clinical outcomes in *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* juin 2013;56(12):1713-21.
49. Reigadas Ramírez E, Bouza ES. Economic Burden of *Clostridium difficile* Infection in European Countries. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1050:1-12.
50. Dubberke ER, Olsen MA. Burden of *Clostridium difficile* on the Healthcare System. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 août 2012;55(Suppl 2):S88-92.
51. Wiegand PN, Nathwani D, Wilcox MH, Stephens J, Shelbaya A, Haider S. Clinical and economic burden of *Clostridium difficile* infection in Europe: a systematic review of healthcare-facility-acquired infection. *J Hosp Infect.* mai 2012;81(1):1-14.
52. Ryan P, Skally M, Duffy F, Farrelly M, Gaughan L, Flood P, et al. Evaluation of fixed and variable hospital costs due to *Clostridium difficile* infection: institutional incentives and directions for future research. *J Hosp Infect.* avr 2017;95(4):415-20.
53. Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P, ESCMID Study Group for *Clostridium difficile*, EU Member States, European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* oct 2006;12 Suppl 6:2-18.
54. Le Monnier A, Duburcq A, Zahar J-R, Corvec S, Guillard T, Cattoir V, et al. Hospital cost of *Clostridium difficile* infection including the contribution of recurrences in French acute-care hospitals. *J Hosp Infect.* oct 2015;91(2):117-22.
55. Grube RF, Heinlein W, Scheffer H, Rathmayer M, Schepp W, Lohse AW, et al. [Economic burden of *Clostridium difficile* enterocolitis in German hospitals based on routine DRG data]. *Z Gastroenterol.* mai 2015;53(5):391-7.

56. Asensio Á, Bouza E, Grau S, Rubio-Rodríguez D, Rubio-Terrés C. Cost of *Clostridium difficile* associated diarrhea in Spain. *Rev Esp Salud Publica*. févr 2013;87(1):25-33.
57. Asensio A, Di Bella S, Lo Vecchio A, Grau S, Hart WM, Isidoro B, et al. The impact of *Clostridium difficile* infection on resource use and costs in hospitals in Spain and Italy: a matched cohort study. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. juill 2015;36:31-8.
58. Poli A, Di Matteo S, Bruno GM, Fornai E, Valentino MC, Colombo GL. Economic burden of *Clostridium difficile* in five hospitals of the Florence health care system in Italy. *Risk Manag Healthc Policy*. 18 nov 2015;8:207-13.
59. Couturier J, Davies K, Gateau C, Barbut F. Ribotypes and New Virulent Strains Across Europe. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1050:45-58.
60. Neely F, Lambert M-L, Van Broeck J, Delmée M. Clinical and laboratory features of the most common *Clostridium difficile* ribotypes isolated in Belgium. *J Hosp Infect*. avr 2017;95(4):394-9.
61. Fawley WN, Davies KA, Morris T, Parnell P, Howe R, Wilcox MH, et al. Enhanced surveillance of *Clostridium difficile* infection occurring outside hospital, England, 2011 to 2013. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 21 juill 2016;21(29).
62. Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun*. sept 1988;56(9):2299-306.
63. Smith A. Outbreak of *Clostridium difficile* infection in an English hospital linked to hypotoxin-producing strains in Canada and the US. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 30 juin 2005;10(6):E050630.2.
64. Kato H, Ito Y, van den Berg RJ, Kuijper EJ, Arakawa Y. First isolation of *Clostridium difficile* 027 in Japan. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 11 janv 2007;12(1):E070111.3.
65. Tae CH, Jung S-A, Song HJ, Kim S-E, Choi HJ, Lee M, et al. The first case of antibiotic-associated colitis by *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Korea. *J Korean Med Sci*. juin 2009;24(3):520-4.
66. Riley TV, Thean S, Hool G, Golledge CL. First Australian isolation of epidemic *Clostridium difficile* PCR ribotype 027. *Med J Aust*. 15 juin 2009;190(12):706-8.
67. van Steenberg J, Debast S, van Kregten E, van den Berg R, Notermans D, Kuijper E. Isolation of *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III in the Netherlands after increase in *C. difficile*-associated diarrhoea. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 14 juill 2005;10(7):E050714.1.
68. Stabler RA, He M, Dawson L, Martin M, Valiente E, Corton C, et al. Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biol*. 2009;10(9):R102.
69. Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet*. 24 sept 2005;366(9491):1079-84.

70. Kuehne SA, Collery MM, Kelly ML, Cartman ST, Cockayne A, Minton NP. Importance of toxin A, toxin B, and CDT in virulence of an epidemic *Clostridium difficile* strain. J Infect Dis. 1 janv 2014;209(1):83-6.
71. Stevenson E, Minton NP, Kuehne SA. The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenicity. Trends Microbiol. mai 2015;23(5):275-82.
72. Akerlund T, Persson I, Unemo M, Svenungsson B, Wullt M, Burman LG. Increased Sporulation Rate of Epidemic *Clostridium difficile* Type O27/NAP1. J Clin Microbiol. 2008;46(4):1530-3.
73. Merrigan M, Venugopal A, Mallozzi M, Roxas B, Viswanathan VK, Johnson S, et al. Human hypervirulent *Clostridium difficile* strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production. J Bacteriol. oct 2010;192(19):4904-11.
74. Centers for Disease Control and Prevention. Vital Signs: Preventing *Clostridium difficile* Infections [Internet]. [cité 12 juill 2018]. Disponible sur: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6109a3.htm?s_cid=mm6109a3_e
75. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med. 26 janv 1989;320(4):204-10.
76. Gerding DN, Olson MM, Peterson LR, Teasley DG, Gebhard RL, Schwartz ML, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis in adults. A prospective case-controlled epidemiologic study. Arch Intern Med. janv 1986;146(1):95-100.
77. Clabots CR, Johnson S, Olson MM, Peterson LR, Gerding DN. Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: evidence for colonized new admissions as a source of infection. J Infect Dis. sept 1992;166(3):561-7.
78. Gotty S, Barbut F, Neyme D, Magne S, Bernardon Y, Ribadeau-Dumas J, et al. *Clostridium difficile* : hygiène des mains et environnement. Hygienes. janv 2003;
79. Samore MH, Venkataraman L, DeGirolami PC, Arbeit RD, Karchmer AW. Clinical and molecular epidemiology of sporadic and clustered cases of nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea. Am J Med. janv 1996;100(1):32-40.
80. Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT. *Clostridium difficile* colitis. N Engl J Med. 27 janv 1994;330(4):257-62.
81. Stevens V, Dumyati G, Fine LS, Fisher SG, van Wijngaarden E. Cumulative antibiotic exposures over time and the risk of *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1 juill 2011;53(1):42-8.
82. Bartlett JG, Gerding DN. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 15 janv 2008;46 Suppl 1:S12-18.
83. Drekonja DM, Amundson WH, Decarolis DD, Kuskowski MA, Lederle FA, Johnson JR. Antimicrobial use and risk for recurrent *Clostridium difficile* infection. Am J Med. nov 2011;124(11):1081.e1-7.
84. Carignan A, Allard C, Pépin J, Cossette B, Nault V, Valiquette L. Risk of *Clostridium difficile* infection after perioperative antibacterial prophylaxis before and during an outbreak of

- infection due to a hypervirulent strain. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 juin 2008;46(12):1838-43.
85. Hensgens MPM, Goorhuis A, Dekkers OM, Kuijper EJ. Time interval of increased risk for *Clostridium difficile* infection after exposure to antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* mars 2012;67(3):742-8.
 86. Mullane KM, Miller MA, Weiss K, Lentnek A, Golan Y, Sears PS, et al. Efficacy of fidaxomicin versus vancomycin as therapy for *Clostridium difficile* infection in individuals taking concomitant antibiotics for other concurrent infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* sept 2011;53(5):440-7.
 87. Chang JY, Antonopoulos DA, Kalra A, Tonelli A, Khalife WT, Schmidt TM, et al. Decreased diversity of the fecal Microbiome in recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Infect Dis.* 1 févr 2008;197(3):435-8.
 88. Kelly CP. Can we identify patients at high risk of recurrent *Clostridium difficile* infection? *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* déc 2012;18 Suppl 6:21-7.
 89. Tannock GW, Munro K, Taylor C, Lawley B, Young W, Byrne B, et al. A new macrocyclic antibiotic, fidaxomicin (OPT-80), causes less alteration to the bowel microbiota of *Clostridium difficile*-infected patients than does vancomycin. *Microbiol Read Engl.* nov 2010;156(Pt 11):3354-9.
 90. Karas JA, Enoch DA, Aliyu SH. A review of mortality due to *Clostridium difficile* infection. *J Infect.* juill 2010;61(1):1-8.
 91. Johnson S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. *J Infect.* juin 2009;58(6):403-10.
 92. Janarthanan S, Ditah I, Adler DG, Ehrinpreis MN. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and proton pump inhibitor therapy: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* juill 2012;107(7):1001-10.
 93. Kwok CS, Arthur AK, Anibueze CI, Singh S, Cavallazzi R, Loke YK. Risk of *Clostridium difficile* infection with acid suppressing drugs and antibiotics: meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* juill 2012;107(7):1011-9.
 94. Cunningham R, Dale B, Undy B, Gaunt N. Proton pump inhibitors as a risk factor for *Clostridium difficile* diarrhoea. *J Hosp Infect.* juill 2003;54(3):243-5.
 95. Williams C. Occurrence and significance of gastric colonization during acid-inhibitory therapy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* juin 2001;15(3):511-21.
 96. Zedtwitz-Liebenstein K, Wenisch C, Patruta S, Parschalk B, Daxböck F, Graninger W. Omeprazole treatment diminishes intra- and extracellular neutrophil reactive oxygen production and bactericidal activity. *Crit Care Med.* mai 2002;30(5):1118-22.
 97. Dumyati G, Stevens V, Hannett GE, Thompson AD, Long C, MacCannell D, et al. Community-associated *Clostridium difficile* Infections, Monroe County, New York, USA. *Emerg Infect Dis.* mars 2012;18(3):392-400.

98. Rogers MAM, Greene MT, Saint S, Chenoweth CE, Malani PN, Trivedi I, et al. Higher Rates of *Clostridium difficile* Infection among Smokers. PLoS ONE. 27 juill 2012;7(7).
99. Wilcox MH, Mooney L, Bendall R, Settle CD, Fawley WN. A case-control study of community-associated *Clostridium difficile* infection. J Antimicrob Chemother. août 2008;62(2):388-96.
100. Rousseau C, Poilane I, De Pontual L, Maherault A-C, Le Monnier A, Collignon A. *Clostridium difficile* carriage in healthy infants in the community: a potential reservoir for pathogenic strains. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. nov 2012;55(9):1209-15.
101. Lessa FC. Community-associated *Clostridium difficile* infection: how real is it? Anaerobe. déc 2013;24:121-3.
102. Pépin J, Gonzales M, Valiquette L. Risk of secondary cases of *Clostridium difficile* infection among household contacts of index cases. J Infect. avr 2012;64(4):387-90.
103. Gould LH, Limbago B. *Clostridium difficile* in food and domestic animals: a new foodborne pathogen? Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1 sept 2010;51(5):577-82.
104. Issa M, Vijayapal A, Graham MB, Beaulieu DB, Otterson MF, Lundeen S, et al. Impact of *Clostridium difficile* on inflammatory bowel disease. Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc. mars 2007;5(3):345-51.
105. Hookman P, Barkin JS. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. World J Gastroenterol WJG. 7 avr 2009;15(13):1554-80.
106. Kurd MF, Pulido L, Joshi A, Purtill JJ, Parvizi J. *Clostridium difficile* infection after total joint arthroplasty: who is at risk? J Arthroplasty. sept 2008;23(6):839-42.
107. Kawecki D, Chmura A, Pacholczyk M, Lagiewska B, Adadynski L, Wasiak D, et al. Detection of *Clostridium difficile* in stool samples from patients in the early period after liver transplantation. Transplant Proc. nov 2007;39(9):2812-5.
108. Emoto M, Kawarabayashi T, Hachisuga MD, Eguchi F, Shirakawa K. *Clostridium difficile* colitis associated with cisplatin-based chemotherapy in ovarian cancer patients. Gynecol Oncol. juin 1996;61(3):369-72.
109. Resnik E, Lefevre CA. Fulminant *Clostridium difficile* colitis associated with paclitaxel and carboplatin chemotherapy. Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc. nov 1999;9(6):512-4.
110. Bartlett JG. *Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. mai 1994;18 Suppl 4:S265-272.
111. Bergogne-Bérézin E. Treatment and prevention of antibiotic associated diarrhea. Int J Antimicrob Agents. déc 2000;16(4):521-6.
112. Lübbert C, John E, von Müller L. *Clostridium difficile* infection: guideline-based diagnosis and treatment. Dtsch Arzteblatt Int. 24 oct 2014;111(43):723-31.
113. Planche T, Wilcox MH. Diagnostic pitfalls in *Clostridium difficile* infection. Infect Dis Clin North Am. mars 2015;29(1):63-82.

114. Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, Eckstein EC, Jump RLP, Donskey CJ. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 oct 2007;45(8):992-8.
115. Ziakas PD, Zacharioudakis IM, Zervou FN, Grigoras C, Pliakos EE, Mylonakis E. Asymptomatic Carriers of Toxigenic *C. difficile* in Long-Term Care Facilities: A Meta-Analysis of Prevalence and Risk Factors. *PLOS ONE*. 23 févr 2015;10(2):e0117195.
116. Shim JK, Johnson S, Samore MH, Bliss DZ, Gerding DN. Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea. *Lancet Lond Engl*. 28 févr 1998;351(9103):633-6.
117. Zacharioudakis IM, Zervou FN, Pliakos EE, Ziakas PD, Mylonakis E. Colonization with toxinogenic *C. difficile* upon hospital admission, and risk of infection: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. mars 2015;110(3):381-90; quiz 391.
118. Mylonakis E, Ryan ET, Calderwood SB. *Clostridium difficile*-Associated diarrhea: A review. *Arch Intern Med*. 26 févr 2001;161(4):525-33.
119. Barbut F, Petit JC. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. août 2001;7(8):405-10.
120. Barbut F, Lalande V, Petit J-C. Épidémiologie et prévention des infections digestives à *Clostridium difficile*. *Rev Fr Lab*. déc 2004;2004(368):27-34.
121. Barbut F, Richard A, Hamadi K, Chomette V, Burghoffer B, Petit JC. Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol*. juin 2000;38(6):2386-8.
122. Olivas AD, Umanskiy K, Zuckerbraun B, Alverdy JC. Avoiding colectomy during surgical management of fulminant *Clostridium difficile* colitis. *Surg Infect*. juin 2010;11(3):299-305.
123. Vaishnavi C. Clinical spectrum & pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases. *Indian J Med Res*. avr 2010;131:487-99.
124. Fekety R, McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg R, Elmer GW, Mulligan ME. Recurrent *Clostridium difficile* diarrhea: characteristics of and risk factors for patients enrolled in a prospective, randomized, double-blinded trial. *Clin Infect Dis*. 1997;24(3):324-33.
125. Wilcox MH, Fawley WN, Settle CD, Davidson A. Recurrence of symptoms in *Clostridium difficile* infection--relapse or reinfection? *J Hosp Infect*. févr 1998;38(2):93-100.
126. Brar HS, Surawicz CM. Pseudomembranous colitis: an update. *Can J Gastroenterol J Can Gastroenterol*. janv 2000;14(1):51-6.
127. García-Lechuz JM, Hernangómez S, Juan RS, Peláez T, Alcalá L, Bouza E. Extra-intestinal infections caused by *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. août 2001;7(8):453-7.
128. Gérard M, Defresne N, Van der Auwera P, Meunier F. Polymicrobial septicemia with *Clostridium difficile* in acute diverticulitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. avr 1989;8(4):300-2.

129. Smith LD, King EO. Occurrence of *Clostridium difficile* in infections of man. J Bacteriol. juill 1962;84(1):65-7.
130. Spencer RC, Courtney SP, Nicol CD. Polymicrobial septicaemia due to *Clostridium difficile* and *Bacteroides fragilis*. Br Med J Clin Res Ed. 1 sept 1984;289(6444):531-2.
131. Jacobs A, Barnard K, Fishel R, Gradon JD. Extracolonic manifestations of *Clostridium difficile* infections. Presentation of 2 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore). mars 2001;80(2):88-101.
132. Libby DB, Bearman G. Bacteremia due to *Clostridium difficile*--review of the literature. Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis. sept 2009;13(5):e305-309.
133. Burnham C-AD, Carroll KC. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. Clin Microbiol Rev. juill 2013;26(3):604-30.
134. Polage CR, Gyorke CE, Kennedy MA, Leslie JL, Chin DL, Wang S, et al. Overdiagnosis of *Clostridium difficile* Infection in the Molecular Test Era. JAMA Intern Med. nov 2015;175(11):1792-801.
135. Crobach MJT, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. déc 2009;15(12):1053-66.
136. Crobach MJT, Baktash A, Duszenko N, Kuijper EJ. Diagnostic Guidance for *C. difficile* Infections. Adv Exp Med Biol. 2018;1050:27-44.
137. Crobach MJT, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. août 2016;22 Suppl 4:S63-81.
138. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). Infect Control Hosp Epidemiol. mai 2010;31(5):431-55.
139. Barbut F, Surgers L, Eckert C, Visseaux B, Cuingnet M, Mesquita C, et al. Does a rapid diagnosis of *Clostridium difficile* infection impact on quality of patient management? Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. févr 2014;20(2):136-44.
140. Hagel S, Epple H-J, Feurle GE, Kern WV, Lynen Jansen P, Malfertheiner P, et al. S2k-guideline gastrointestinal infectious diseases and Whipple's disease. Z Gastroenterol. mai 2015;53(5):418-59.
141. Manthey CF, Eckmann L, Fuhrmann V. Therapy for *Clostridium difficile* infection - any news beyond Metronidazole and Vancomycin? Expert Rev Clin Pharmacol. nov 2017;10(11):1239-50.
142. Fujitani S, George WL, Murthy AR. Comparison of clinical severity score indices for *Clostridium difficile* infection. Infect Control Hosp Epidemiol. mars 2011;32(3):220-8.

143. Hensgens MPM, Dekkers OM, Goorhuis A, LeCessie S, Kuijper EJ. Predicting a complicated course of *Clostridium difficile* infection at the bedside. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. mai 2014;20(5):O301-308.
144. Dinh A, Bouchand F, Le Monnier A. Actualités épidémiologiques et thérapeutiques des infections à *Clostridium difficile*. Rev Médecine Interne. 1 sept 2015;36(9):596-602.
145. Cruz MP. Fidaxomicin (Dificid), a Novel Oral Macrocyclic Antibacterial Agent For the Treatment of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea in Adults. Pharm Ther. mai 2012;37(5):278-81.
146. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. Am J Gastroenterol. avr 2013;108(4):478-98; quiz 499.
147. Al-Nassir WN, Sethi AK, Nerandzic MM, Bobulsky GS, Jump RLP, Donskey CJ. Comparison of clinical and microbiological response to treatment of *Clostridium difficile*-associated disease with metronidazole and vancomycin. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1 juill 2008;47(1):56-62.
148. Johnson S, Louie TJ, Gerding DN, Cornely OA, Chasan-Taber S, Fitts D, et al. Vancomycin, metronidazole, or tolevamer for *Clostridium difficile* infection: results from two multinational, randomized, controlled trials. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1 août 2014;59(3):345-54.
149. Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KMLST, Davis MB. A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1 août 2007;45(3):302-7.
150. Rokas KEE, Johnson JW, Beardsley JR, Ohl CA, Luther VP, Williamson JC. The Addition of Intravenous Metronidazole to Oral Vancomycin is Associated With Improved Mortality in Critically Ill Patients With *Clostridium difficile* Infection. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 15 sept 2015;61(6):934-41.
151. Lagrotteria D, Holmes S, Smieja M, Smaill F, Lee C. Prospective, randomized inpatient study of oral metronidazole versus oral metronidazole and rifampin for treatment of primary episode of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1 sept 2006;43(5):547-52.
152. Fekety R, Silva J, Kauffman C, Buggy B, Deery HG. Treatment of antibiotic-associated *Clostridium difficile* colitis with oral vancomycin: comparison of two dosage regimens. Am J Med. janv 1989;86(1):15-9.
153. Cornely OA, Crook DW, Esposito R, Poirier A, Somero MS, Weiss K, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for infection with *Clostridium difficile* in Europe, Canada, and the USA: a double-blind, non-inferiority, randomised controlled trial. Lancet Infect Dis. avr 2012;12(4):281-9.
154. Halloran TJ. Convulsions associated with high cumulative doses of metronidazole. Drug Intell Clin Pharm. mai 1982;16(5):409.
155. McFarland LV, Elmer GW, Surawicz CM. Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. Am J Gastroenterol. juill 2002;97(7):1769-75.

156. Shue YK, Sears PS, Shangle S, Walsh RB, Lee C, Gorbach SL, et al. Safety, Tolerance, and Pharmacokinetic Studies of OPT-80 in Healthy Volunteers following Single and Multiple Oral Doses. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2008;52(4):1391-5.
157. Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, Weiss K, Lentnek A, Golan Y, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med.* 3 févr 2011;364(5):422-31.
158. Fehér C, Múñez Rubio E, Merino Amador P, Delgado-Iribarren Garcia-Campero A, Salavert M, Merino E, et al. The efficacy of fidaxomicin in the treatment of *Clostridium difficile* infection in a real-world clinical setting: a Spanish multi-centre retrospective cohort. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* févr 2017;36(2):295-303.
159. Petrella LA, Sambol SP, Cheknis A, Nagaro K, Kean Y, Sears PS, et al. Decreased cure and increased recurrence rates for *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic *C. difficile* BI strain. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* août 2012;55(3):351-7.
160. Nathwani D, Cornely OA, Van Engen AK, Odufowora-Sita O, Retsa P, Odeyemi IAO. Cost-effectiveness analysis of fidaxomicin versus vancomycin in *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother.* nov 2014;69(11):2901-12.
161. de Lalla F, Nicolini R, Rinaldi E, Scarpellini P, Rigoli R, Manfrin V, et al. Prospective study of oral teicoplanin versus oral vancomycin for therapy of pseudomembranous colitis and *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 1992;36(10):2192-6.
162. Wenisch C, Parschalk B, Hasenhüdl M, Hirschl AM, Graninger W. Comparison of Vancomycin, Teicoplanin, Metronidazole, and Fusidic Acid for the Treatment of *Clostridium difficile*—Associated Diarrhea. *Clin Infect Dis.* 1 mai 1996;22(5):813-8.
163. Herpers BL, Vlamincx B, Burkhardt O, Blom H, Biemond-Moeniralam HS, Hornef M, et al. Intravenous tigecycline as adjunctive or alternative therapy for severe refractory *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 juin 2009;48(12):1732-5.
164. Kopterides P, Papageorgiou C, Antoniadou A, Papadomichelakis E, Tsangaris I, Dimopoulou I, et al. Failure of tigecycline to treat severe *Clostridium difficile* infection. *Anaesth Intensive Care.* juill 2010;38(4):755-8.
165. Garey KW, Ghantaji SS, Shah DN, Habib M, Arora V, Jiang Z-D, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study to assess the ability of rifaximin to prevent recurrent diarrhoea in patients with *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother.* déc 2011;66(12):2850-5.
166. Johnson S, Schriever C, Galang M, Kelly CP, Gerding DN. Interruption of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea episodes by serial therapy with vancomycin and rifaximin. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 mars 2007;44(6):846-8.
167. Spigaglia P. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. *Ther Adv Infect Dis.* févr 2016;3(1):23-42.
168. Johannesen PA, Mackin KE, Hutton ML, Awad MM, Larcombe S, Amy JM, et al. Disruption of the Gut Microbiome: *Clostridium difficile* Infection and the Threat of Antibiotic Resistance. *Genes.* 21 déc 2015;6(4):1347-60.

169. He M, Miyajima F, Roberts P, Ellison L, Pickard DJ, Martin MJ, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. Nat Genet. janv 2013;45(1):109-13.
170. Goudarzi M, Goudarzi H, Alebouyeh M, Azimi Rad M, Shayegan Mehr FS, Zali MR, et al. Antimicrobial Susceptibility of *Clostridium difficile* Clinical Isolates in Iran. Iran Red Crescent Med J. août 2013;15(8):704-11.
171. Adler A, Miller-Roll T, Bradenstein R, Block C, Mendelson B, Parizade M, et al. A national survey of the molecular epidemiology of *Clostridium difficile* in Israel: the dissemination of the ribotype 027 strain with reduced susceptibility to vancomycin and metronidazole. Diagn Microbiol Infect Dis. sept 2015;83(1):21-4.
172. Leffler DA, Lamont JT. *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med. 16 avr 2015;372(16):1539-48.
173. Freeman J, Vernon J, Morris K, Nicholson S, Todhunter S, Longshaw C, et al. Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. mars 2015;21(3):248.e9-248.e16.
174. Norman KN, Scott HM, Harvey RB, Norby B, Hume ME. Comparison of antimicrobial susceptibility among *Clostridium difficile* isolated from an integrated human and swine population in Texas. Foodborne Pathog Dis. avr 2014;11(4):257-64.
175. Jin D, Luo Y, Huang C, Cai J, Ye J, Zheng Y, et al. Molecular Epidemiology of *Clostridium difficile* Infection in Hospitalized Patients in Eastern China. J Clin Microbiol. 2017;55(3):801-10.
176. Baghani A, Ghourchian S, Aliramezani A, Yaseri M, Mesdaghinia A, Douraghi M. Highly antibiotic-resistant *Clostridium difficile* isolates from Iranian patients. J Appl Microbiol. 29 juin 2018;
177. Baines SD, Wilcox MH. Antimicrobial Resistance and Reduced Susceptibility in *Clostridium difficile*: Potential Consequences for Induction, Treatment, and Recurrence of C. difficile Infection. Antibiotics. 10 juill 2015;4(3):267-98.
178. Linkevicius M, Sandegren L, Andersson DI. Potential of Tetracycline Resistance Proteins To Evolve Tigecycline Resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2 janv 2016;60(2):789-96.
179. Goldstein EJC, Babakhani F, Citron DM. Antimicrobial activities of fidaxomicin. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. août 2012;55 Suppl 2:S143-148.
180. Leeds JA, Sachdeva M, Mullin S, Barnes SW, Ruzin A. In vitro selection, via serial passage, of *Clostridium difficile* mutants with reduced susceptibility to fidaxomicin or vancomycin. J Antimicrob Chemother. janv 2014;69(1):41-4.
181. Kelly CR, Kahn S, Kashyap P, Laine L, Rubin D, Atreja A, et al. Update on Fecal Microbiota Transplantation 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms, and Outlook. Gastroenterology. juill 2015;149(1):223-37.
182. Trubiano JA, Gardiner B, Kwong JC, Ward P, Testro AG, Charles PGP. Faecal microbiota transplantation for severe *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. Eur J Gastroenterol Hepatol. févr 2013;25(2):255-7.

183. Gough E, Shaikh H, Manges AR. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. nov 2011;53(10):994-1002.
184. Kelly CR, Ihunnah C, Fischer M, Khoruts A, Surawicz C, Afzali A, et al. Fecal microbiota transplant for treatment of *Clostridium difficile* infection in immunocompromised patients. Am J Gastroenterol. juill 2014;109(7):1065-71.
185. Gerding DN, Meyer T, Lee C, Cohen SH, Murthy UK, Poirier A, et al. Administration of spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3 for prevention of recurrent C. difficile infection: a randomized clinical trial. JAMA. 5 mai 2015;313(17):1719-27.
186. Lowy I, Molrine DC, Leav BA, Blair BM, Baxter R, Gerding DN, et al. Treatment with Monoclonal Antibodies against *Clostridium difficile* Toxins. N Engl J Med. 21 janv 2010;362(3):197-205.
187. Thompson I. *Clostridium difficile*-associated disease: update and focus on non-antibiotic strategies. Age Ageing. janv 2008;37(1):14-8.
188. Weiss K. Toxin-binding treatment for *Clostridium difficile*: a review including reports of studies with tolevamer. Int J Antimicrob Agents. janv 2009;33(1):4-7.
189. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. mars 2014;20 Suppl 2:1-26.
190. Leav BA, Blair B, Leney M, Knauber M, Reilly C, Lowy I, et al. Serum anti-toxin B antibody correlates with protection from recurrent *Clostridium difficile* infection (CDI). Vaccine. 22 janv 2010;28(4):965-9.
191. McFarland LV. Therapies on the horizon for *Clostridium difficile* infections. Expert Opin Investig Drugs. 2016;25(5):541-55.
192. Bruxelle J-F, Mizrahi A, Hoys S, Collignon A, Janoir C, Péchiné S. Immunogenic properties of the surface layer precursor of *Clostridium difficile* and vaccination assays in animal models. Anaerobe. févr 2016;37:78-84.
193. Mizrahi A, Collignon A, Péchiné S. Passive and active immunization strategies against *Clostridium difficile* infections: State of the art. Anaerobe. 1 déc 2014;30:210-9.
194. Drudy D, Calabi E, Kyne L, Sougioultzis S, Kelly E, Fairweather N, et al. Human antibody response to surface layer proteins in *Clostridium difficile* infection. FEMS Immunol Med Microbiol. 1 juill 2004;41(3):237-42.
195. Solomon K. The host immune response to *Clostridium difficile* infection. Ther Adv Infect Dis. févr 2013;1(1):19-35.
196. Pothoulakis C. Pathogenesis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. Eur J Gastroenterol Hepatol. nov 1996;8(11):1041-7.
197. Shen A. *Clostridium difficile* toxins: mediators of inflammation. J Innate Immun. 2012;4(2):149-58.

198. Bartlett JG. Treatment of antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Rev Infect Dis.* avr 1984;6 Suppl 1:S235-241.
199. Mueller XM. Drug immunosuppression therapy for adult heart transplantation. Part 1: immune response to allograft and mechanism of action of immunosuppressants. *Ann Thorac Surg.* 1 janv 2004;77(1):354-62.
200. Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med.* 15 déc 1993;119(12):1198-208.
201. Wojciechowski AL, Parameswaran GI, Mattappallil A, Mergenhausen KA. Corticosteroid use is associated with a reduced incidence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a retrospective cohort study. *Anaerobe.* déc 2014;30:27-9.
202. Cavagnaro C, Berezin S, Medow M. Corticosteroid treatment of severe, non-responsive *Clostridium difficile* induced colitis. *Arch Dis Child.* avr 2003;88(4):342-4.
203. Das R, Feuerstadt P, Brandt LJ. Glucocorticoids are associated with increased risk of short-term mortality in hospitalized patients with *clostridium difficile*-associated disease. *Am J Gastroenterol.* sept 2010;105(9):2040-9.
204. Sun X, Wang H, Zhang Y, Chen K, Davis B, Feng H. Mouse Relapse Model of *Clostridium difficile* Infection. *Infect Immun.* juill 2011;79(7):2856-64.
205. Kim HB, Wang Y, Sun X. A Detrimental Role of Immunosuppressive Drug, Dexamethasone, During *Clostridium difficile* Infection in Association with a Gastrointestinal Microbial Shift. *J Microbiol Biotechnol.* mars 2016;26(3):567-71.
206. Haran JP, Bradley E, Howe E, Wu X, Tjia J. Medication Exposure and Risk of Recurrent *Clostridium difficile* Infection in Community-Dwelling Older People and Nursing Home Residents. *J Am Geriatr Soc.* févr 2018;66(2):333-8.
207. D'Aoust J, Battat R, Bessissow T. Management of inflammatory bowel disease with *Clostridium difficile* infection. *World J Gastroenterol.* 21 juill 2017;23(27):4986-5003.
208. Navaneethan U, Venkatesh PG, Shen B. *Clostridium difficile* infection and inflammatory bowel disease: Understanding the evolving relationship. *World J Gastroenterol WJG.* 21 oct 2010;16(39):4892-904.
209. Schneeweiss S, Korzenik J, Solomon DH, Canning C, Lee J, Bressler B. Infliximab and other immunomodulating drugs in patients with inflammatory bowel disease and the risk of serious bacterial infections. *Aliment Pharmacol Ther.* août 2009;30(3):253-64.
210. Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA. *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends Microbiol.* juill 2014;22(7):406-16.
211. Deakin LJ, Clare S, Fagan RP, Dawson LF, Pickard DJ, West MR, et al. The *Clostridium difficile* spo0A gene is a persistence and transmission factor. *Infect Immun.* août 2012;80(8):2704-11.
212. Theriot CM, Young VB. Interactions Between the Gastrointestinal Microbiome and *Clostridium difficile*. *Annu Rev Microbiol.* 2015;69:445-61.

213. Bhattacharjee D, Francis MB, Ding X, McAllister KN, Shrestha R, Sorg JA. Reexamining the Germination Phenotypes of Several *Clostridium difficile* Strains Suggests Another Role for the CspC Germinant Receptor. *J Bacteriol.* 14 déc 2015;198(5):777-86.
214. Buffie CG, Bucci V, Stein RR, McKenney PT, Ling L, Gobourne A, et al. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature.* janv 2015;517(7533):205-8.
215. Theriot CM, Bowman AA, Young VB. Antibiotic-Induced Alterations of the Gut Microbiota Alter Secondary Bile Acid Production and Allow for *Clostridium difficile* Spore Germination and Outgrowth in the Large Intestine. *mSphere.* févr 2016;1(1).
216. Janoir C, Péchiné S, Grosdidier C, Collignon A. Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins. *J Bacteriol.* oct 2007;189(20):7174-80.
217. Calabi E, Calabi F, Phillips AD, Fairweather NF. Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. *Infect Immun.* oct 2002;70(10):5770-8.
218. Waligora A-J, Hennequin C, Mullany P, Bourlioux P, Collignon A, Karjalainen T. Characterization of a Cell Surface Protein of *Clostridium difficile* with Adhesive Properties. *Infect Immun.* avr 2001;69(4):2144-53.
219. Hennequin C, Janoir C, Barc M-C, Collignon A, Karjalainen T. Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiol Read Engl.* oct 2003;149(Pt 10):2779-87.
220. Hennequin C, Porcheray F, Waligora-Dupriet A, Collignon A, Barc M, Bourlioux P, et al. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiol Read Engl.* janv 2001;147(Pt 1):87-96.
221. Jank T, Aktories K. Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. *Trends Microbiol.* mai 2008;16(5):222-9.
222. Barth H, Aktories K, Popoff MR, Stiles BG. Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* sept 2004;68(3):373-402.
223. Hasegawa M, Yamazaki T, Kamada N, Tawaratsumida K, Kim Y-G, Núñez G, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain 1 mediates recognition of *Clostridium difficile* and induces neutrophil recruitment and protection against the pathogen. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 avr 2011;186(8):4872-80.
224. Yoshino Y, Kitazawa T, Ikeda M, Tatsuno K, Yanagimoto S, Okugawa S, et al. *Clostridium difficile* flagellin stimulates toll-like receptor 5, and toxin B promotes flagellin-induced chemokine production via TLR5. *Life Sci.* 27 févr 2013;92(3):211-7.
225. Ryan A, Lynch M, Smith SM, Amu S, Nel HJ, McCoy CE, et al. A Role for TLR4 in *Clostridium difficile* Infection and the Recognition of Surface Layer Proteins. *PLOS Pathog.* 30 juin 2011;7(6):e1002076.
226. Giesemann T, Guttenberg G, Aktories K. Human α -Defensins Inhibit *Clostridium difficile* Toxin B. *Gastroenterology.* 1 juin 2008;134(7):2049-58.

227. Hing TC, Ho S, Shih DQ, Ichikawa R, Cheng M, Chen J, et al. The antimicrobial peptide cathelicidin modulates *Clostridium difficile*-associated colitis and toxin A-mediated enteritis in mice. *Gut*. sept 2013;62(9):1295-305.
228. McQuade R, Roxas B, Viswanathan VK, Vedantam G. *Clostridium difficile* clinical isolates exhibit variable susceptibility and proteome alterations upon exposure to mammalian cationic antimicrobial peptides. *Anaerobe*. déc 2012;18(6):614-20.
229. Ho TD, Ellermeier CD. PrsW is required for colonization, resistance to antimicrobial peptides, and expression of extracytoplasmic function σ factors in *Clostridium difficile*. *Infect Immun*. août 2011;79(8):3229-38.
230. Suárez JM, Edwards AN, McBride SM. The *Clostridium difficile* cpr Locus Is Regulated by a Noncontiguous Two-Component System in Response to Type A and B Lantibiotics. *J Bacteriol*. 6 janv 2013;195(11):2621-31.
231. McBride SM, Sonenshein AL. The *dlt* operon confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Clostridium difficile*. *Microbiol Read Engl*. mai 2011;157(Pt 5):1457-65.
232. Henriques AO, Moran CP. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annu Rev Microbiol*. 2007;61:555-88.
233. Permpoonpattana P, Phetcharaburanin J, Mikelsone A, Dembek M, Tan S, Brisson M-C, et al. Functional Characterization of *Clostridium difficile* Spore Coat Proteins. *J Bacteriol*. 4 janv 2013;195(7):1492-503.
234. Barra-Carrasco J, Olgúin-Araneda V, Plaza-Garrido A, Miranda-Cárdenas C, Cofré-Araneda G, Pizarro-Guajardo M, et al. The *Clostridium difficile* exosporium cysteine (CdeC)-rich protein is required for exosporium morphogenesis and coat assembly. *J Bacteriol*. sept 2013;195(17):3863-75.
235. Francis MB, Allen CA, Shrestha R, Sorg JA. Bile acid recognition by the *Clostridium difficile* germinant receptor, CspC, is important for establishing infection. *PLoS Pathog*. mai 2013;9(5):e1003356.
236. Pizarro-Guajardo M, Olgúin-Araneda V, Barra-Carrasco J, Brito-Silva C, Sarker MR, Paredes-Sabja D. Characterization of the collagen-like exosporium protein, BclA1, of *Clostridium difficile* spores. *Anaerobe*. févr 2014;25:18-30.
237. Bozue J, Moody KL, Cote CK, Stiles BG, Friedlander AM, Welkos SL, et al. *Bacillus anthracis* Spores of the *bclA* Mutant Exhibit Increased Adherence to Epithelial Cells, Fibroblasts, and Endothelial Cells but Not to Macrophages. *Infect Immun*. 9 janv 2007;75(9):4498-505.
238. Brahmbhatt TN, Janes BK, Stibitz ES, Darnell SC, Sanz P, Rasmussen SB, et al. *Bacillus anthracis* exosporium protein BclA affects spore germination, interaction with extracellular matrix proteins, and hydrophobicity. *Infect Immun*. nov 2007;75(11):5233-9.
239. Abt MC, McKenney PT, Pamer EG. *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nat Rev Microbiol*. oct 2016;14(10):609-20.
240. Dembek M, Barquist L, Boinett CJ, Cain AK, Mayho M, Lawley TD, et al. High-Throughput Analysis of Gene Essentiality and Sporulation in *Clostridium difficile*. *mBio*. 5 janv 2015;6(2):e02383-14.

241. Edwards AN, McBride SM. Initiation of sporulation in *Clostridium difficile*: a twist on the classic model. FEMS Microbiol Lett. sept 2014;358(2):110-8.
242. Underwood S, Guan S, Vijayasubhash V, Baines SD, Graham L, Lewis RJ, et al. Characterization of the Sporulation Initiation Pathway of *Clostridium difficile* and Its Role in Toxin Production. J Bacteriol. déc 2009;191(23):7296-305.
243. Pettit LJ, Browne HP, Yu L, Smits WK, Fagan RP, Barquist L, et al. Functional genomics reveals that *Clostridium difficile* Spo0A coordinates sporulation, virulence and metabolism. BMC Genomics. 25 févr 2014;15(1):160.
244. Dineen SS, McBride SM, Sonenshein AL. Integration of Metabolism and Virulence by *Clostridium difficile* CodY. J Bacteriol. 15 oct 2010;192(20):5350-62.
245. Antunes A, Camiade E, Monot M, Courtois E, Barbut F, Sernova NV, et al. Global transcriptional control by glucose and carbon regulator CcpA in *Clostridium difficile*. Nucleic Acids Res. nov 2012;40(21):10701-18.
246. de Hoon MJL, Eichenberger P, Vitkup D. Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. Curr Biol CB. 14 sept 2010;20(17):R735-745.
247. Finlaid KA, Bond JP, Schutz KC, Putnam EE, Leung JM, Lawley TD, et al. Global Analysis of the Sporulation Pathway of *Clostridium difficile*. PLOS Genet. 8 août 2013;9(8):e1003660.
248. Pereira FC, Saujet L, Tomé AR, Serrano M, Monot M, Couture-Tosi E, et al. The Spore Differentiation Pathway in the Enteric Pathogen *Clostridium difficile*. PLOS Genet. 3 oct 2013;9(10):e1003782.
249. Antonopoulos DA, Huse SM, Morrison HG, Schmidt TM, Sogin ML, Young VB. Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. Infect Immun. juin 2009;77(6):2367-75.
250. Robinson CJ, Young VB. Antibiotic administration alters the community structure of the gastrointestinal microbiota. Gut Microbes. juill 2010;1(4):279-84.
251. Hamilton MJ, Weingarden AR, Unno T, Khoruts A, Sadowsky MJ. High-throughput DNA sequence analysis reveals stable engraftment of gut microbiota following transplantation of previously frozen fecal bacteria. Gut Microbes. avr 2013;4(2):125-35.
252. Antharam VC, Li EC, Ishmael A, Sharma A, Mai V, Rand KH, et al. Intestinal dysbiosis and depletion of butyrogenic bacteria in *Clostridium difficile* infection and nosocomial diarrhea. J Clin Microbiol. sept 2013;51(9):2884-92.
253. Pakpour S, Bhanvadia A, Zhu R, Amarnani A, Gibbons SM, Gurry T, et al. Identifying predictive features of *Clostridium difficile* infection recurrence before, during, and after primary antibiotic treatment. Microbiome. 13 nov 2017;5(1):148.
254. Weingarden AR, Chen C, Bobr A, Yao D, Lu Y, Nelson VM, et al. Microbiota transplantation restores normal fecal bile acid composition in recurrent *Clostridium difficile* infection. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 15 févr 2014;306(4):G310-319.
255. Ridlon JM, Kang D-J, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. J Lipid Res. févr 2006;47(2):241-59.

256. Morris GN, Winter J, Cato EP, Ritchie AE, Bokkenheuser VD. *Clostridium scindens* sp., a Human Intestinal Bacterium with Desmolytic Activity on Corticoids. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1985;35(4):478-81.
257. Wilson KH, Kennedy MJ, Fekety FR. Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* mars 1982;15(3):443-6.
258. Sorg JA, Sonenshein AL. Chenodeoxycholate is an inhibitor of *Clostridium difficile* spore germination. *J Bacteriol.* févr 2009;191(3):1115-7.
259. Sorg JA, Sonenshein AL. Inhibiting the initiation of *Clostridium difficile* spore germination using analogs of chenodeoxycholic acid, a bile acid. *J Bacteriol.* oct 2010;192(19):4983-90.
260. Wang S, Shen A, Setlow P, Li Y. Characterization of the Dynamic Germination of Individual *Clostridium difficile* Spores Using Raman Spectroscopy and Differential Interference Contrast Microscopy. *J Bacteriol.* juill 2015;197(14):2361-73.
261. Francis MB, Allen CA, Sorg JA. Spore Cortex Hydrolysis Precedes Dipicolinic Acid Release during *Clostridium difficile* Spore Germination. *J Bacteriol.* 15 juill 2015;197(14):2276-83.
262. Adams CM, Eckenroth BE, Putnam EE, Doublé S, Shen A. Structural and functional analysis of the CspB protease required for *Clostridium* spore germination. *PLoS Pathog.* févr 2013;9(2):e1003165.
263. Kevorkian Y, Shirley DJ, Shen A. Regulation of *Clostridium difficile* spore germination by the CspA pseudoprotease domain. *Biochimie.* mars 2016;122:243-54.
264. Burns DA, Heap JT, Minton NP. SleC is essential for germination of *Clostridium difficile* spores in nutrient-rich medium supplemented with the bile salt taurocholate. *J Bacteriol.* févr 2010;192(3):657-64.
265. Dembek M, Stabler RA, Witney AA, Wren BW, Fairweather NF. Transcriptional analysis of temporal gene expression in germinating *Clostridium difficile* 630 endospores. *PloS One.* 2013;8(5):e64011.
266. Carlson PE, Kaiser AM, McColm SA, Bauer JM, Young VB, Aronoff DM, et al. Variation in germination of *Clostridium difficile* clinical isolates correlates to disease severity. *Anaerobe.* juin 2015;33:64-70.
267. Moore P, Kyne L, Martin A, Solomon K. Germination efficiency of clinical *Clostridium difficile* spores and correlation with ribotype, disease severity and therapy failure. *J Med Microbiol.* sept 2013;62(Pt 9):1405-13.
268. Davis KM, Weiser JN. Modifications to the peptidoglycan backbone help bacteria to establish infection. *Infect Immun.* févr 2011;79(2):562-70.
269. Peltier J, Courtin P, El Meouche I, Lemée L, Chapot-Chartier M-P, Pons J-L. *Clostridium difficile* has an original peptidoglycan structure with a high level of N-acetylglucosamine deacetylation and mainly 3-3 cross-links. *J Biol Chem.* 19 août 2011;286(33):29053-62.
270. Ho TD, Williams KB, Chen Y, Helm RF, Popham DL, Ellermeier CD. *Clostridium difficile* Extracytoplasmic Function σ Factor σ_V Regulates Lysozyme Resistance and Is Necessary for Pathogenesis in the Hamster Model of Infection. *Infect Immun.* 6 janv 2014;82(6):2345-55.

271. Furci L, Baldan R, Bianchini V, Trovato A, Ossi C, Cichero P, et al. New role for human α -defensin 5 in the fight against hypervirulent *Clostridium difficile* strains. *Infect Immun*. mars 2015;83(3):986-95.
272. Revilla-Guarinos A, Gebhard S, Mascher T, Zúñiga M. Defence against antimicrobial peptides: different strategies in *Firmicutes*. *Environ Microbiol*. mai 2014;16(5):1225-37.
273. Sára M, Sleytr UB. S-Layer proteins. *J Bacteriol*. févr 2000;182(4):859-68.
274. Dang THT, de la Riva L, Fagan RP, Storck EM, Heal WP, Janoir C, et al. Chemical probes of surface layer biogenesis in *Clostridium difficile*. *ACS Chem Biol*. 19 mars 2010;5(3):279-85.
275. Janoir C. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe*. févr 2016;37:13-24.
276. Calabi E, Fairweather N. Patterns of sequence conservation in the S-Layer proteins and related sequences in *Clostridium difficile*. *J Bacteriol*. juill 2002;184(14):3886-97.
277. Fagan RP, Albesa-Jové D, Qazi O, Svergun DI, Brown KA, Fairweather NF. Structural insights into the molecular organization of the S-layer from *Clostridium difficile*. *Mol Microbiol*. mars 2009;71(5):1308-22.
278. Merrigan MM, Venugopal A, Roxas JL, Anwar F, Mallozzi MJ, Roxas BAP, et al. Surface-layer protein A (SlpA) is a major contributor to host-cell adherence of *Clostridium difficile*. *PloS One*. 2013;8(11):e78404.
279. Sebahia M, Peck MW, Minton NP, Thomson NR, Holden MTG, Mitchell WJ, et al. Genome sequence of a proteolytic (Group I) *Clostridium botulinum* strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes. *Genome Res*. juill 2007;17(7):1082-92.
280. Emerson JE, Stabler RA, Wren BW, Fairweather NF. Microarray analysis of the transcriptional responses of *Clostridium difficile* to environmental and antibiotic stress. *J Med Microbiol*. juin 2008;57(Pt 6):757-64.
281. Karjalainen T, Waligora-Dupriet AJ, Cerquetti M, Spigaglia P, Maggioni A, Mauri P, et al. Molecular and genomic analysis of genes encoding surface-anchored proteins from *Clostridium difficile*. *Infect Immun*. mai 2001;69(5):3442-6.
282. Dingle KE, Didelot X, Ansari MA, Eyre DW, Vaughan A, Griffiths D, et al. Recombinational switching of the *Clostridium difficile* S-layer and a novel glycosylation gene cluster revealed by large-scale whole-genome sequencing. *J Infect Dis*. 15 févr 2013;207(4):675-86.
283. Biazzo M, Cioncada R, Fiaschi L, Tedde V, Spigaglia P, Mastrantonio P, et al. Diversity of cwp loci in clinical isolates of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol*. sept 2013;62(Pt 9):1444-52.
284. Wright A, Wait R, Begum S, Crossett B, Nagy J, Brown K, et al. Proteomic analysis of cell surface proteins from *Clostridium difficile*. *Proteomics*. juin 2005;5(9):2443-52.
285. Wright A, Drudy D, Kyne L, Brown K, Fairweather NF. Immunoreactive cell wall proteins of *Clostridium difficile* identified by human sera. *J Med Microbiol*. juin 2008;57(Pt 6):750-6.

286. de la Riva L, Willing SE, Tate EW, Fairweather NF. Roles of cysteine proteases Cwp84 and Cwp13 in biogenesis of the cell wall of *Clostridium difficile*. J Bacteriol. juill 2011;193(13):3276-85.
287. Janoir C, Grénerly J, Savariau-Lacomme M-P, Collignon A. Characterization of an extracellular protease from *Clostridium difficile*. Pathol Biol (Paris). oct 2004;52(8):444-9.
288. Chapetón Montes D, Candela T, Collignon A, Janoir C. Localization of the *Clostridium difficile* Cysteine Protease Cwp84 and Insights into Its Maturation Process. J Bacteriol. oct 2011;193(19):5314-21.
289. Emerson JE, Reynolds CB, Fagan RP, Shaw HA, Goulding D, Fairweather NF. A novel genetic switch controls phase variable expression of CwpV, a *Clostridium difficile* cell wall protein. Mol Microbiol. nov 2009;74(3):541-56.
290. Reynolds CB, Emerson JE, de la Riva L, Fagan RP, Fairweather NF. The *Clostridium difficile* Cell Wall Protein CwpV is Antigenically Variable between Strains, but Exhibits Conserved Aggregation-Promoting Function. PLoS Pathog. 21 avr 2011;7(4).
291. Cerquetti M, Serafino A, Sebastianelli A, Mastrantonio P. Binding of *Clostridium difficile* to Caco-2 epithelial cell line and to extracellular matrix proteins. FEMS Immunol Med Microbiol. 18 févr 2002;32(3):211-8.
292. Lin Y-P, Kuo C-J, Koleci X, McDonough SP, Chang Y-F. Manganese Binds to *Clostridium difficile* Fbp68 and Is Essential for Fibronectin Binding. J Biol Chem. 2 avr 2011;286(5):3957-69.
293. Barketi-Klai A, Hoys S, Lambert-Bordes S, Collignon A, Kansau I. Role of fibronectin-binding protein A in *Clostridium difficile* intestinal colonization. J Med Microbiol. 8 janv 2011;60(8):1155-61.
294. Cafardi V, Biagini M, Martinelli M, Leuzzi R, Rubino JT, Cantini F, et al. Identification of a novel zinc metalloprotease through a global analysis of *Clostridium difficile* extracellular proteins. PLoS One. 2013;8(11):e81306.
295. Duesbery NS, Webb CP, Leppla SH, Gordon VM, Klimpel KR, Copeland TD, et al. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. Science. 1 mai 1998;280(5364):734-7.
296. Donahue EH, Dawson LF, Valiente E, Firth-Clark S, Major MR, Littler E, et al. *Clostridium difficile* has a single sortase, SrtB, that can be inhibited by small-molecule inhibitors. BMC Microbiol. 31 août 2014;14(1):219.
297. Tulli L, Marchi S, Petracca R, Shaw HA, Fairweather NF, Scarselli M, et al. CbpA: a novel surface exposed adhesin of *Clostridium difficile* targeting human collagen. Cell Microbiol. oct 2013;15(10):1674-87.
298. Hennequin C, Collignon A, Karjalainen T. Analysis of expression of GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* in response to stress. Microb Pathog. nov 2001;31(5):255-60.
299. Péchiné S, Hennequin C, Boursier C, Hoys S, Collignon A. Immunization using GroEL decreases *Clostridium difficile* intestinal colonization. PLoS One. 2013;8(11):e81112.

300. Harshey RM. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:249-73.
301. Duan Q, Zhou M, Zhu L, Zhu G. Flagella and bacterial pathogenicity. *J Basic Microbiol.* janv 2013;53(1):1-8.
302. Aubry A, Hussack G, Chen W, KuoLee R, Twine SM, Fulton KM, et al. Modulation of Toxin Production by the Flagellar Regulon in *Clostridium difficile*. *Infect Immun.* oct 2012;80(10):3521-32.
303. Nachamkin I, Yang XH, Stern NJ. Role of *Campylobacter jejuni* flagella as colonization factors for three-day-old chicks: analysis with flagellar mutants. *Appl Environ Microbiol.* mai 1993;59(5):1269-73.
304. Richardson K. Roles of motility and flagellar structure in pathogenicity of *Vibrio cholerae*: analysis of motility mutants in three animal models. *Infect Immun.* août 1991;59(8):2727-36.
305. Dunne C, Dolan B, Clyne M. Factors that mediate colonization of the human stomach by *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol WJG.* 21 mai 2014;20(19):5610-24.
306. Postnova T, Gomez-Duarte OG, Richardson K. Motility mutants of *Vibrio cholerae* O1 have reduced adherence in vitro to human small intestinal epithelial cells as demonstrated by ELISA. *Microbiology.* 1 oct 1996;142(10):2767-76.
307. Konkel ME, Klena JD, Rivera-Amill V, Monteville MR, Biswas D, Raphael B, et al. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J Bacteriol.* juin 2004;186(11):3296-303.
308. Tasteyre A, Barc MC, Karjalainen T, Dodson P, Hyde S, Bourlioux P, et al. A *Clostridium difficile* gene encoding flagellin. *Microbiol Read Engl.* avr 2000;146 (Pt 4):957-66.
309. Tasteyre A, Barc MC, Collignon A, Boureau H, Karjalainen T. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect Immun.* déc 2001;69(12):7937-40.
310. Twine SM, Reid CW, Aubry A, McMullin DR, Fulton KM, Austin J, et al. Motility and flagellar glycosylation in *Clostridium difficile*. *J Bacteriol.* nov 2009;191(22):7050-62.
311. Samatey FA, Imada K, Nagashima S, Vonderviszt F, Kumasaka T, Yamamoto M, et al. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature.* 15 mars 2001;410(6826):331-7.
312. Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature.* 7 août 2003;424(6949):643-50.
313. Mimori-Kiyosue Y, Vonderviszt F, Namba K. Locations of terminal segments of flagellin in the filament structure and their roles in polymerization and polymorphism. *J Mol Biol.* 11 juill 1997;270(2):222-37.
314. Nempont C, Cayet D, Rumbo M, Bompard C, Villeret V, Sirard J-C. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 août 2008;181(3):2036-43.

315. Liu F, Yang J, Zhang Y, Zhou D, Chen Y, Gai W, et al. Recombinant flagellins with partial deletions of the hypervariable domain lose antigenicity but not mucosal adjuvancy. *Biochem Biophys Res Commun*. 19 févr 2010;392(4):582-7.
316. Janoir C, Denève C, Bouttier S, Barbut F, Hoys S, Caleechum L, et al. Adaptive strategies and pathogenesis of *Clostridium difficile* from *in vivo* transcriptomics. *Infect Immun*. oct 2013;81(10):3757-69.
317. Tasteyre A, Karjalainen T, Avesani V, Delmée M, Collignon A, Bourlioux P, et al. Molecular Characterization of *fliD* Gene Encoding Flagellar Cap and Its Expression among *Clostridium difficile* Isolates from Different Serogroups. *J Clin Microbiol*. mars 2001;39(3):1178-83.
318. Faulds-Pain A, Twine SM, Vinogradov E, Strong PCR, Dell A, Buckley AM, et al. The post-translational modification of the *Clostridium difficile* flagellin affects motility, cell surface properties and virulence. *Mol Microbiol*. oct 2014;94(2):272-89.
319. Dawson LF, Valiente E, Wren BW. *Clostridium difficile*--a continually evolving and problematic pathogen. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. déc 2009;9(6):1410-7.
320. Derman Y, Söderholm H, Lindström M, Korkeala H. Role of *csp* genes in NaCl, pH, and ethanol stress response and motility in *Clostridium botulinum* ATCC 3502. *Food Microbiol*. avr 2015;46:463-70.
321. Soutourina OA, Bertin PN. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. oct 2003;27(4):505-23.
322. Saujet L, Monot M, Dupuy B, Soutourina O, Martin-Verstraete I. The key sigma factor of transition phase, SigH, controls sporulation, metabolism, and virulence factor expression in *Clostridium difficile*. *J Bacteriol*. juill 2011;193(13):3186-96.
323. Scaria J, Janvilisri T, Fubini S, Gleed RD, McDonough SP, Chang Y-F. *Clostridium difficile* Transcriptome Analysis Using Pig Ligated Loop Model Reveals Modulation of Pathways Not Modulated *In Vitro*. *J Infect Dis*. 1 juin 2011;203(11):1613-20.
324. Péchiné S, Janoir C, Collignon A. Variability of *Clostridium difficile* surface proteins and specific serum antibody response in patients with *Clostridium difficile*-associated disease. *J Clin Microbiol*. oct 2005;43(10):5018-25.
325. Dingle TC, Mulvey GL, Armstrong GD. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, *FliC* and *FliD*, and their contribution to virulence in hamsters. *Infect Immun*. oct 2011;79(10):4061-7.
326. Baban ST, Kuehne SA, Barketi-Klai A, Cartman ST, Kelly ML, Hardie KR, et al. The Role of Flagella in *Clostridium difficile* Pathogenesis: Comparison between a Non-Epidemic and an Epidemic Strain. *PLoS ONE*. 23 sept 2013;8(9):e73026.
327. Barketi-Klai A, Monot M, Hoys S, Lambert-Bordes S, Kuehne SA, Minton N, et al. The flagellin *FliC* of *Clostridium difficile* is responsible for pleiotropic gene regulation during *in vivo* infection. *PloS One*. 2014;9(5):e96876.
328. El Meouche I, Peltier J, Monot M, Soutourina O, Pestel-Caron M, Dupuy B, et al. Characterization of the SigD regulon of *C. difficile* and its positive control of toxin production through the regulation of *tcdR*. *PloS One*. 2013;8(12):e83748.

329. McKee RW, Mangalea MR, Purcell EB, Borchardt EK, Tamayo R. The second messenger cyclic Di-GMP regulates *Clostridium difficile* toxin production by controlling expression of sigD. J Bacteriol. nov 2013;195(22):5174-85.
330. Awad MM, Johanesen PA, Carter GP, Rose E, Lyras D. *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. Gut Microbes. 2014;5(5):579-93.
331. Smits WK. Hype or hypervirulence: a reflection on problematic *C. difficile* strains. Virulence. 1 oct 2013;4(7):592-6.
332. Hammond GA, Johnson JL. The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463. Microb Pathog. oct 1995;19(4):203-13.
333. Braun V, Hundsberger T, Leukel P, Sauerborn M, von Eichel-Streiber C. Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. Gene. 28 nov 1996;181(1-2):29-38.
334. Monot M, Eckert C, Lemire A, Hamiot A, Dubois T, Tessier C, et al. *Clostridium difficile*: New Insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus. Sci Rep. 8 oct 2015;5:15023.
335. Mani N, Lyras D, Barroso L, Howarth P, Wilkins T, Rood JI, et al. Environmental response and autoregulation of *Clostridium difficile* TxeR, a sigma factor for toxin gene expression. J Bacteriol. nov 2002;184(21):5971-8.
336. Mani N, Dupuy B. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. Proc Natl Acad Sci U S A. 8 mai 2001;98(10):5844-9.
337. Dupuy B, Govind R, Antunes A, Matamouros S. *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. J Med Microbiol. juin 2008;57(Pt 6):685-9.
338. Tan KS, Wee BY, Song KP. Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. J Med Microbiol. juill 2001;50(7):613-9.
339. Govind R, Dupuy B. Secretion of *Clostridium difficile* toxins A and B requires the holin-like protein TcdE. PLoS Pathog. 2012;8(6):e1002727.
340. Olling A, Seehase S, Minton NP, Tatge H, Schröter S, Kohlscheen S, et al. Release of TcdA and TcdB from *Clostridium difficile* cdi 630 is not affected by functional inactivation of the tcdE gene. Microb Pathog. janv 2012;52(1):92-100.
341. Karlsson S, Dupuy B, Mukherjee K, Norin E, Burman LG, Akerlund T. Expression of *Clostridium difficile* toxins A and B and their sigma factor TcdD is controlled by temperature. Infect Immun. avr 2003;71(4):1784-93.
342. Karlsson S, Lindberg A, Norin E, Burman LG, Akerlund T. Toxins, butyric acid, and other short-chain fatty acids are coordinately expressed and down-regulated by cysteine in *Clostridium difficile*. Infect Immun. oct 2000;68(10):5881-8.
343. Aldape MJ, Packham AE, Nute DW, Bryant AE, Stevens DL. Effects of ciprofloxacin on the expression and production of exotoxins by *Clostridium difficile*. J Med Microbiol. mai 2013;62(Pt 5):741-7.

344. Chilton CH, Freeman J, Crowther GS, Todhunter SL, Nicholson S, Wilcox MH. Co-amoxiclav induces proliferation and cytotoxin production of *Clostridium difficile* ribotype 027 in a human gut model. *J Antimicrob Chemother.* avr 2012;67(4):951-4.
345. Dupuy B, Sonenshein AL. Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. *Mol Microbiol.* janv 1998;27(1):107-20.
346. Mackin KE, Carter GP, Howarth P, Rood JI, Lyras D. Spo0A differentially regulates toxin production in evolutionarily diverse strains of *Clostridium difficile*. *PLoS One.* 2013;8(11):e79666.
347. Rosenbusch KE, Bakker D, Kuijper EJ, Smits WK. *C. difficile* 630 Δ erm Spo0A regulates sporulation, but does not contribute to toxin production, by direct high-affinity binding to target DNA. *PLoS One.* 2012;7(10):e48608.
348. Bouillaut L, Dubois T, Sonenshein AL, Dupuy B. Integration of metabolism and virulence in *Clostridium difficile*. *Res Microbiol.* mai 2015;166(4):375-83.
349. Lyerly DM, Saum KE, MacDonald DK, Wilkins TD. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infect Immun.* févr 1985;47(2):349-52.
350. Mitchell TJ, Ketley JM, Haslam SC, Stephen J, Burdon DW, Candy DC, et al. Effect of toxin A and B of *Clostridium difficile* on rabbit ileum and colon. *Gut.* janv 1986;27(1):78-85.
351. Triadafilopoulos G, Pothoulakis C, O'Brien MJ, LaMont JT. Differential effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on rabbit ileum. *Gastroenterology.* août 1987;93(2):273-9.
352. Riegler M, Sedivy R, Pothoulakis C, Hamilton G, Zacherl J, Bischof G, et al. *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. *J Clin Invest.* mai 1995;95(5):2004-11.
353. Savidge TC, Pan W-H, Newman P, O'Brien M, Anton PM, Pothoulakis C. *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. *Gastroenterology.* août 2003;125(2):413-20.
354. Chumbler NM, Rutherford SA, Zhang Z, Farrow MA, Lisher JP, Farquhar E, et al. Crystal structure of *Clostridium difficile* toxin A. *Nat Microbiol.* janv 2016;1(1):15002.
355. Pruitt RN, Chumbler NM, Rutherford SA, Farrow MA, Friedman DB, Spiller B, et al. Structural determinants of *Clostridium difficile* toxin A glucosyltransferase activity. *J Biol Chem.* 9 mars 2012;287(11):8013-20.
356. Papatheodorou P, Zamboglou C, Genisyuerk S, Guttenberg G, Aktories K. Clostridial glucosylating toxins enter cells via clathrin-mediated endocytosis. *PLoS One.* 17 mai 2010;5(5):e10673.
357. Greco A, Ho JGS, Lin S-J, Palcic MM, Rupnik M, Ng KK-S. Carbohydrate recognition by *Clostridium difficile* toxin A. *Nat Struct Mol Biol.* mai 2006;13(5):460-1.
358. Murase T, Eugenio L, Schorr M, Hussack G, Tanha J, Kitova EN, et al. Structural basis for antibody recognition in the receptor-binding domains of toxins A and B from *Clostridium difficile*. *J Biol Chem.* 24 janv 2014;289(4):2331-43.

359. Sauerborn M, Leukel P, von Eichel-Streiber C. The C-terminal ligand-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A (TcdA) abrogates TcdA-specific binding to cells and prevents mouse lethality. *FEMS Microbiol Lett.* 1 oct 1997;155(1):45-54.
360. Genisyuerk S, Papatheodorou P, Guttenberg G, Schubert R, Benz R, Aktories K. Structural determinants for membrane insertion, pore formation and translocation of *Clostridium difficile* toxin B. *Mol Microbiol.* mars 2011;79(6):1643-54.
361. Schorch B, Song S, van Diemen FR, Bock HH, May P, Herz J, et al. LRP1 is a receptor for *Clostridium perfringens* TpeL toxin indicating a two-receptor model of clostridial glycosylating toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29 avr 2014;111(17):6431-6.
362. LaFrance ME, Farrow MA, Chandrasekaran R, Sheng J, Rubin DH, Lacy DB. Identification of an epithelial cell receptor responsible for *Clostridium difficile* TcdB-induced cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2 juin 2015;112(22):7073-8.
363. Yuan P, Zhang H, Cai C, Zhu S, Zhou Y, Yang X, et al. Chondroitin sulfate proteoglycan 4 functions as the cellular receptor for *Clostridium difficile* toxin B. *Cell Res.* févr 2015;25(2):157-68.
364. Terada N, Ohno N, Murata S, Katoh R, Stallcup WB, Ohno S. Immunohistochemical study of NG2 chondroitin sulfate proteoglycan expression in the small and large intestines. *Histochem Cell Biol.* oct 2006;126(4):483-90.
365. Shen A, Lupardus PJ, Gersch MM, Puri AW, Albrow VE, Garcia KC, et al. Defining an allosteric circuit in the cysteine protease domain of *Clostridium difficile* toxins. *Nat Struct Mol Biol.* mars 2011;18(3):364-71.
366. Egerer M, Giesemann T, Jank T, Satchell KJF, Aktories K. Auto-catalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxins A and B depends on cysteine protease activity. *J Biol Chem.* 31 août 2007;282(35):25314-21.
367. Just I, Wilm M, Selzer J, Rex G, von Eichel-Streiber C, Mann M, et al. The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J Biol Chem.* 9 juin 1995;270(23):13932-6.
368. Just I, Selzer J, Wilm M, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature.* 8 juin 1995;375(6531):500-3.
369. Brito GAC, Fujji J, Carneiro-Filho BA, Lima AAM, Obrig T, Guerrant RL. Mechanism of *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis in T84 cells. *J Infect Dis.* 15 nov 2002;186(10):1438-47.
370. Farrow MA, Chumbler NM, Lapierre LA, Franklin JL, Rutherford SA, Goldenring JR, et al. *Clostridium difficile* toxin B-induced necrosis is mediated by the host epithelial cell NADPH oxidase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 nov 2013;110(46):18674-9.
371. Slater L, Hett E, Mark K, Chumbler NM, Patel D, Lacy DB, et al. Identification of Novel Host-Targeted Compounds That Protect from Anthrax Lethal Toxin-Induced Cell Death - ACS Chemical Biology (ACS Publications). *ACS Chem Biol.* janv 2013;8(4):812-22.
372. Tam J, Beilhartz GL, Auger A, Gupta P, Therien AG, Melnyk RA. Small molecule inhibitors of *Clostridium difficile* toxin B-induced cellular damage. *Chem Biol.* 19 févr 2015;22(2):175-85.

373. Bender KO, Garland M, Ferreyra JA, Hryckowian AJ, Child MA, Puri AW, et al. A small-molecule antivirulence agent for treating *Clostridium difficile* infection. *Sci Transl Med*. 23 sept 2015;7(306):306ra148.
374. Smith SME, Min J, Ganesh T, Diebold B, Kawahara T, Zhu Y, et al. Ebselen and congeners inhibit NADPH oxidase 2-dependent superoxide generation by interrupting the binding of regulatory subunits. *Chem Biol*. 22 juin 2012;19(6):752-63.
375. Carter GP, Chakravorty A, Nguyen TAP, Mileto S, Schreiber F, Li L, et al. Defining the Roles of TcdA and TcdB in Localized Gastrointestinal Disease, Systemic Organ Damage, and the Host Response during *Clostridium difficile* Infections. *mBio*. 7 janv 2015;6(3):e00551-15.
376. Drudy D, Fanning S, Kyne L. Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. janv 2007;11(1):5-10.
377. King AM, Mackin KE, Lyras D. Emergence of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains: epidemiological and clinical considerations. *Future Microbiol*. 2015;10(1):1-4.
378. Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K. *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes*. févr 2014;5(1):15-27.
379. Perelle S, Gibert M, Bourlioux P, Corthier G, Popoff MR. Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. *Infect Immun*. avr 1997;65(4):1402-7.
380. Gonçalves C, Decré D, Barbut F, Burghoffer B, Petit J-C. Prevalence and Characterization of a Binary Toxin (Actin-Specific ADP-Ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. mai 2004;42(5):1933-9.
381. Stare BG, Delmée M, Rupnik M. Variant forms of the binary toxin CDT locus and tcdC gene in *Clostridium difficile* strains. *J Med Microbiol*. mars 2007;56(Pt 3):329-35.
382. Carter GP, Lyras D, Allen DL, Mackin KE, Howarth PM, O'Connor JR, et al. Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. *J Bacteriol*. oct 2007;189(20):7290-301.
383. Metcalf DS, Weese JS. Binary toxin locus analysis in *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol*. août 2011;60(Pt 8):1137-45.
384. Papatheodorou P, Carette JE, Bell GW, Schwan C, Guttenberg G, Brummelkamp TR, et al. Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin *Clostridium difficile* transferase (CDT). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 sept 2011;108(39):16422-7.
385. Hemmasi S, Czulkies BA, Schorch B, Veit A, Aktories K, Papatheodorou P. Interaction of the *Clostridium difficile* Binary Toxin CDT and Its Host Cell Receptor, Lipolysis-stimulated Lipoprotein Receptor (LSR). *J Biol Chem*. 29 mai 2015;290(22):14031-44.
386. Papatheodorou P, Hornuss D, Nölke T, Hemmasi S, picchianti M, Aktories K. *Clostridium difficile* Binary Toxin CDT Induces Clustering of the Lipolysis-Stimulated Lipoprotein Receptor into Lipid Rafts. *mBio*. avr 2013;4(3):00244-13.

387. Davies AH, Roberts AK, Shone CC, Acharya KR. Super toxins from a super bug: structure and function of *Clostridium difficile* toxins. *Biochem J.* 15 juin 2011;436(3):517-26.
388. Aktories K, Schwan C, Papatheodorou P, Lang AE. Bidirectional attack on the actin cytoskeleton. Bacterial protein toxins causing polymerization or depolymerization of actin. *Toxicol Off J Int Soc Toxinology.* 15 sept 2012;60(4):572-81.
389. Schwan C, Nölke T, Kruppke AS, Schubert DM, Lang AE, Aktories K. Cholesterol- and sphingolipid-rich microdomains are essential for microtubule-based membrane protrusions induced by *Clostridium difficile* transferase (CDT). *J Biol Chem.* 19 août 2011;286(33):29356-65.
390. Androga GO, Hart J, Foster NF, Charles A, Forbes D, Riley TV. Infection with Toxin A-Negative, Toxin B-Negative, Binary Toxin-Positive *Clostridium difficile* in a Young Patient with Ulcerative Colitis. *J Clin Microbiol.* nov 2015;53(11):3702-4.
391. Eckert C, Emirian A, Le Monnier A, Cathala L, De Montclos H, Goret J, et al. Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B. *New Microbes New Infect.* 8 nov 2014;3:12-7.
392. Frosali S, Pagliari D, Gambassi G, Landolfi R, Pandolfi F, Cianci R. How the Intricate Interaction among Toll-Like Receptors, Microbiota, and Intestinal Immunity Can Influence Gastrointestinal Pathology. *J Immunol Res.* 2015;2015:489821.
393. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 18 oct 2007;449(7164):819-26.
394. Yiu JHC, Dorweiler B, Woo CW. Interaction between gut microbiota and toll-like receptor: from immunity to metabolism. *J Mol Med Berl Ger.* 2017;95(1):13-20.
395. Sieling PA, Modlin RL. Toll-like receptors: mammalian « taste receptors » for a smorgasbord of microbial invaders. *Curr Opin Microbiol.* févr 2002;5(1):70-5.
396. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev.* sept 2012;249(1):158-75.
397. Vidya MK, Kumar VG, Sejian V, Bagath M, Krishnan G, Bhatta R. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *Int Rev Immunol.* 2 janv 2018;37(1):20-36.
398. Reuven EM, Fink A, Shai Y. Regulation of innate immune responses by transmembrane interactions: lessons from the TLR family. *Biochim Biophys Acta.* juin 2014;1838(6):1586-93.
399. Garcia-Martinez I, Shaker ME, Mehal WZ. Therapeutic Opportunities in Damage-Associated Molecular Pattern-Driven Metabolic Diseases. *Antioxid Redox Signal.* 10 déc 2015;23(17):1305-15.
400. Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 janv 2002;168(2):554-61.
401. Yu S, Gao N. Compartmentalizing intestinal epithelial cell toll-like receptors for immune surveillance. *Cell Mol Life Sci CMLS.* sept 2015;72(17):3343-53.

402. Joosten LAB, Abdollahi-Roodsaz S, Dinarello CA, O'Neill L, Netea MG. Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(6):344-57.
403. Aksoy E, Taboubi S, Torres D, Delbauve S, Hachani A, Whitehead MA, et al. The p110 δ isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock. *Nat Immunol.* nov 2012;13(11):1045-54.
404. Hornef MW, Normark BH, Vandewalle A, Normark S. Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J Exp Med.* 20 oct 2003;198(8):1225-35.
405. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* mai 2006;13(5):816-25.
406. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(2):131-44.
407. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun.* déc 2000;68(12):7010-7.
408. Hamonic G, Pasternak JA, Wilson HL. Recognizing conserved non-canonical localization patterns of toll-like receptors in tissues and across species. *Cell Tissue Res.* avr 2018;372(1):1-11.
409. Santaolalla R, Fukata M, Abreu MT. Innate immunity in the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol.* mars 2011;27(2):125-31.
410. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* juill 2005;129(1):50-65.
411. Vamadevan AS, Fukata M, Arnold ET, Thomas LS, Hsu D, Abreu MT. Regulation of Toll-like receptor 4-associated MD-2 in intestinal epithelial cells: a comprehensive analysis. *Innate Immun.* avr 2010;16(2):93-103.
412. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014;5:461.
413. Pachathundikandi SK, Lind J, Tegtmeyer N, El-Omar EM, Backert S. Interplay of the Gastric Pathogen *Helicobacter pylori* with Toll-Like Receptors. *BioMed Res Int.* 2015;2015:192420.
414. Arthur JSC, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol.* sept 2013;13(9):679-92.
415. Pålsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology.* oct 2004;113(2):153-62.
416. Mogensen TH. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin Microbiol Rev.* 4 janv 2009;22(2):240-73.
417. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature.* 21 nov 2002;420(6913):324-9.

418. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*. déc 1997;7(6):837-47.
419. Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16 avr 2002;99(8):5567-72.
420. Flannery S, Bowie AG. The interleukin-1 receptor-associated kinases: critical regulators of innate immune signalling. *Biochem Pharmacol*. 15 déc 2010;80(12):1981-91.
421. Adhikari A, Xu M, Chen ZJ. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene*. 14 mai 2007;26(22):3214-26.
422. Chen F, Bhatia D, Chang Q, Castranova V. Finding NEMO by K63-linked polyubiquitin chain. *Cell Death Differ*. nov 2006;13(11):1835-8.
423. Moriguchi T, Kuroyanagi N, Yamaguchi K, Gotoh Y, Irie K, Kano T, et al. A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J Biol Chem*. 7 juin 1996;271(23):13675-9.
424. Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, Karin M. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I-kappaB kinase complex. *Nature*. 17 sept 1998;395(6699):297-300.
425. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*. 19 juill 2001;412(6844):346-51.
426. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 15 sept 2004;18(18):2195-224.
427. Baeuerle PA, Baltimore D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell*. 22 avr 1988;53(2):211-7.
428. Gilmore TD, Temin HM. Different localization of the product of the v-rel oncogene in chicken fibroblasts and spleen cells correlates with transformation by REV-T. *Cell*. 14 mars 1986;44(5):791-800.
429. Steward R, Zusman SB, Huang LH, Schedl P. The dorsal protein is distributed in a gradient in early Drosophila embryos. *Cell*. 4 nov 1988;55(3):487-95.
430. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*. 26 déc 1986;47(6):921-8.
431. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 30 oct 2006;25(51):6680-4.
432. Gilmore TD. NF-kappa B, KBF1, dorsal, and related matters. *Cell*. 7 sept 1990;62(5):841-3.
433. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. oct 2009;1(4):a000034.
434. Kunsch C, Ruben SM, Rosen CA. Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. oct 1992;12(10):4412-21.

435. Whiteside ST, Israël A. I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol.* avr 1997;8(2):75-82.
436. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 1 août 2003;301(5633):640-3.
437. Klement JF, Rice NR, Car BD, Abbondanzo SJ, Powers GD, Bhatt PH, et al. IkappaBalpha deficiency results in a sustained NF-kappaB response and severe widespread dermatitis in mice. *Mol Cell Biol.* mai 1996;16(5):2341-9.
438. Oshiumi H, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem.* 12 déc 2003;278(50):49751-62.
439. Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, et al. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol.* mai 2004;5(5):503-7.
440. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med.* nov 2007;13(11):460-9.
441. Sasai M, Oshiumi H, Matsumoto M, Inoue N, Fujita F, Nakanishi M, et al. Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 janv 2005;174(1):27-30.
442. Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou G-P, Lin R, Hiscott J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science.* 16 mai 2003;300(5622):1148-51.
443. Gauzzi MC, Del Cornò M, Gessani S. Dissecting TLR3 signalling in dendritic cells. *Immunobiology.* oct 2010;215(9-10):713-23.
444. Lin R, Heylbroeck C, Genin P, Pitha PM, Hiscott J. Essential role of interferon regulatory factor 3 in direct activation of RANTES chemokine transcription. *Mol Cell Biol.* févr 1999;19(2):959-66.
445. Hansen A, Alston L, Tulk SE, Schenck LP, Grassie ME, Alhassan BF, et al. The P2Y6 receptor mediates *Clostridium difficile* toxin-induced CXCL8/IL-8 production and intestinal epithelial barrier dysfunction. *PLoS One.* 2013;8(11):e81491.
446. Mahida YR, Makh S, Hyde S, Gray T, Borriello SP. Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human intestinal epithelial cells: induction of interleukin 8 production and apoptosis after cell detachment. *Gut.* mars 1996;38(3):337-47.
447. Bobo LD, El Feghaly RE, Chen Y-S, Dubberke ER, Han Z, Baker AH, et al. MAPK-Activated Protein Kinase 2 Contributes to *Clostridium difficile*-Associated Inflammation. *Infect Immun.* mars 2013;81(3):713-22.
448. Na X, Zhao D, Koon HW, Kim H, Husmark J, Moyer MP, et al. *Clostridium difficile* toxin B activates the EGF receptor and the ERK/MAP kinase pathway in human colonocytes. *Gastroenterology.* avr 2005;128(4):1002-11.

449. Frädriich C, Beer L-A, Gerhard R. Reactive Oxygen Species as Additional Determinants for Cytotoxicity of *Clostridium difficile* Toxins A and B. *Toxins*. 18 janv 2016;8(1).
450. He D, Sougioultzis S, Hagen S, Liu J, Keates S, Keates AC, et al. *Clostridium difficile* toxin A triggers human colonocyte IL-8 release via mitochondrial oxygen radical generation. *Gastroenterology*. avr 2002;122(4):1048-57.
451. Kim H, Rhee SH, Kokkotou E, Na X, Savidge T, Moyer MP, et al. *Clostridium difficile* toxin A regulates inducible cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis in colonocytes via reactive oxygen species and activation of p38 MAPK. *J Biol Chem*. 3 juin 2005;280(22):21237-45.
452. Castagliuolo I, Keates AC, Wang CC, Pasha A, Valenick L, Kelly CP, et al. *Clostridium difficile* toxin A stimulates macrophage-inflammatory protein-2 production in rat intestinal epithelial cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 juin 1998;160(12):6039-45.
453. Kim JM, Kim JS, Jung HC, Oh Y, Song IS, Kim CY. Differential Expression and Polarized Secretion of CXCL1 and CXCL2 Chemokines by Human Intestinal Epithelial Cancer Cell Lines in Response to *Clostridium difficile* Toxin A. *Microbiol Immunol*. 1 mai 2002;46(5):333-42.
454. Sun X, Hirota SA. The roles of host and pathogen factors and the innate immune response in the pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *Mol Immunol*. févr 2015;63(2):193-202.
455. Warny M, Keates AC, Keates S, Castagliuolo I, Zacks JK, Aboudola S, et al. p38 MAP kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis. *J Clin Invest*. 15 avr 2000;105(8):1147-56.
456. Meyer GKA, Neetz A, Brandes G, Tsikas D, Butterfield JH, Just I, et al. *Clostridium difficile* Toxins A and B Directly Stimulate Human Mast Cells. *Infect Immun*. août 2007;75(8):3868-76.
457. Jafari NV, Kuehne SA, Bryant CE, Elawad M, Wren BW, Minton NP, et al. *Clostridium difficile* modulates host innate immunity via toxin-independent and dependent mechanism(s). *PLoS One*. 2013;8(7):e69846.
458. van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LAB. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol*. mars 2011;32(3):110-6.
459. Ausiello CM, Cerquetti M, Fedele G, Spensieri F, Palazzo R, Nasso M, et al. Surface layer proteins from *Clostridium difficile* induce inflammatory and regulatory cytokines in human monocytes and dendritic cells. *Microbes Infect*. sept 2006;8(11):2640-6.
460. Bianco M, Fedele G, Quattrini A, Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P, et al. Immunomodulatory activities of surface-layer proteins obtained from epidemic and hypervirulent *Clostridium difficile* strains. *J Med Microbiol*. 2011;
461. Collins LE, Lynch M, Marszalowska I, Kristek M, Rochfort K, O'Connell M, et al. Surface layer proteins isolated from *Clostridium difficile* induce clearance responses in macrophages. *Microbes Infect*. mai 2014;16(5):391-400.
462. Péchiné S, Collignon A. Immune responses induced by *Clostridium difficile*. *Anaerobe*. oct 2016;41:68-78.

463. Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SLR, Cookson BT, Logan SM, et al. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28 juin 2005;102(26):9247-52.
464. Rumbo M, Nempont C, Kraehenbuhl J-P, Sirard J-C. Mucosal interplay among commensal and pathogenic bacteria: lessons from flagellin and Toll-like receptor 5. *FEBS Lett*. 22 mai 2006;580(12):2976-84.
465. Batah J, Denève-Larrazet C, Jolivot P-A, Kuehne S, Collignon A, Marvaud J-C, et al. *Clostridium difficile* flagella predominantly activate TLR5-linked NF-κB pathway in epithelial cells. *Anaerobe*. avr 2016;38:116-24.
466. Jarchum I, Liu M, Lipuma L, Pamer EG. Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute *Clostridium difficile* colitis. *Infect Immun*. avr 2011;79(4):1498-503.
467. Aronsson B, Granström M, Möllby R, Nord CE. Serum antibody response to *Clostridium difficile* toxins in patients with *Clostridium difficile* diarrhoea. *Infection*. juin 1985;13(3):97-101.
468. Johnson S, Gerding DN, Janoff EN. Systemic and mucosal antibody responses to toxin A in patients infected with *Clostridium difficile*. *J Infect Dis*. déc 1992;166(6):1287-94.
469. Warny M, Fatimi A, Bostwick EF, Laine DC, Lebel F, LaMont JT, et al. Bovine immunoglobulin concentrate-*clostridium difficile* retains *C difficile* toxin neutralising activity after passage through the human stomach and small intestine. *Gut*. févr 1999;44(2):212-7.
470. Kelly CP, Pothoulakis C, Orellana J, LaMont JT. Human colonic aspirates containing immunoglobulin A antibody to *Clostridium difficile* toxin A inhibit toxin A-receptor binding. *Gastroenterology*. janv 1992;102(1):35-40.
471. Sánchez-Hurtado K, Corretge M, Mutlu E, McIlhagger R, Starr JM, Poxton IR. Systemic antibody response to *Clostridium difficile* in colonized patients with and without symptoms and matched controls. *J Med Microbiol*. juin 2008;57(Pt 6):717-24.
472. Viscidi R, Laughon BE, Yolken R, Bo-Linn P, Moench T, Ryder RW, et al. Serum antibody response to toxins A and B of *Clostridium difficile*. *J Infect Dis*. juill 1983;148(1):93-100.
473. Warny M, Vaerman JP, Avesani V, Delmée M. Human antibody response to *Clostridium difficile* toxin A in relation to clinical course of infection. *Infect Immun*. févr 1994;62(2):384-9.
474. Johal SS, Lambert CP, Hammond J, James PD, Borriello SP, Mahida YR. Colonic IgA producing cells and macrophages are reduced in recurrent and non-recurrent *Clostridium difficile* associated diarrhoea. *J Clin Pathol*. sept 2004;57(9):973-9.
475. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet Lond Engl*. 20 janv 2001;357(9251):189-93.
476. Péchiné S, Gleizes A, Janoir C, Gorges-Kergot R, Barc M-C, Delmée M, et al. Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol*. févr 2005;54(Pt 2):193-6.
477. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med*. 10 févr 2000;342(6):390-7.

478. Mulligan ME, Miller SD, McFarland LV, Fung HC, Kwok RY. Elevated levels of serum immunoglobulins in asymptomatic carriers of *Clostridium difficile*. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. juin 1993;16 Suppl 4:S239-244.
479. Katchar K, Taylor CP, Tummala S, Chen X, Sheikh J, Kelly CP. Association between IgG2 and IgG3 subclass responses to toxin A and recurrent *Clostridium difficile*-associated disease. Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc. juin 2007;5(6):707-13.
480. Johnston PF, Gerding DN, Knight KL. Protection from *Clostridium difficile* infection in CD4 T Cell- and polymeric immunoglobulin receptor-deficient mice. Infect Immun. févr 2014;82(2):522-31.
481. Buffie CG, Jarchum I, Equinda M, Lipuma L, Gobourne A, Viale A, et al. Profound alterations of intestinal microbiota following a single dose of clindamycin results in sustained susceptibility to *Clostridium difficile*-induced colitis. Infect Immun. janv 2012;80(1):62-73.
482. Lawley TD, Clare S, Walker AW, Goulding D, Stabler RA, Croucher N, et al. Antibiotic treatment of *Clostridium difficile* carrier mice triggers a supershedder state, spore-mediated transmission, and severe disease in immunocompromised hosts. Infect Immun. sept 2009;77(9):3661-9.
483. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. Plant Cell. avr 1990;2(4):279-89.
484. Guo S, Kemphues KJ. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell. 19 mai 1995;81(4):611-20.
485. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 19 févr 1998;391(6669):806-11.
486. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. Nature. 16 mars 2000;404(6775):293-6.
487. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature. 18 janv 2001;409(6818):363-6.
488. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. Cell. 6 sept 2002;110(5):563-74.
489. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev. 15 janv 2001;15(2):188-200.
490. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. Science. 26 oct 2001;294(5543):858-62.
491. Ambros V, Horvitz HR. Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Science. 26 oct 1984;226(4673):409-16.
492. Ha I, Wightman B, Ruvkun G. A bulged lin-4/lin-14 RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans* lin-14 temporal gradient formation. Genes Dev. 12 janv 1996;10(23):3041-50.

493. Ambros V. A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell*. 7 avr 1989;57(1):49-57.
494. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 3 déc 1993;75(5):843-54.
495. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 3 déc 1993;75(5):855-62.
496. Olsen PH, Ambros V. The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol*. 15 déc 1999;216(2):671-80.
497. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 24 févr 2000;403(6772):901-6.
498. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 26 oct 2001;294(5543):862-4.
499. Roux J, González-Porta M, Robinson-Rechavi M. Comparative analysis of human and mouse expression data illuminates tissue-specific evolutionary patterns of miRNAs. *Nucleic Acids Res*. juill 2012;40(13):5890-900.
500. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. 3 janv 2003;9(3):277-9.
501. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. janv 2009;19(1):92-105.
502. Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJC. The Long and Short of MicroRNA. *Cell*. 25 avr 2013;153(3):516-9.
503. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. sept 2010;11(9):597-610.
504. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 20 févr 2009;136(4):642-55.
505. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. févr 2009;10(2):126-39.
506. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. oct 2004;14(10A):1902-10.
507. Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6 nov 2007;104(45):17719-24.
508. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*. janv 2008;36(Database issue):D154-158.
509. Tam W. Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene*. 22 août 2001;274(1-2):157-67.

510. Lee Y, Jeon K, Lee J-T, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2 sept 2002;21(17):4663-70.
511. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 13 oct 2004;23(20):4051-60.
512. Kim Y-K, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.* 7 févr 2007;26(3):775-83.
513. Oszolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* 15 nov 2008;22(22):3172-83.
514. Corcoran DL, Pandit KV, Gordon B, Bhattacharjee A, Kaminski N, Benos PV. Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data. *PLoS One.* 2009;4(4):e5279.
515. Monteys AM, Spengler RM, Wan J, Tecedor L, Lennox KA, Xing Y, et al. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA.* mars 2010;16(3):495-505.
516. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* déc 2004;10(12):1957-66.
517. Gu J, He T, Pei Y, Li F, Wang X, Zhang J, et al. Primary transcripts and expressions of mammal intergenic microRNAs detected by mapping ESTs to their flanking sequences. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc.* oct 2006;17(10):1033-41.
518. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Nam J-W, Heo I, Rhee J-K, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell.* 2 juin 2006;125(5):887-901.
519. Gregory RI, Yan K-P, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 11 nov 2004;432(7014):235-40.
520. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Kim Y-K, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 15 déc 2004;18(24):3016-27.
521. Yeom K-H, Lee Y, Han J, Suh MR, Kim VN. Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(16):4622-9.
522. Shiohama A, Sasaki T, Noda S, Minoshima S, Shimizu N. Nucleolar localization of DGCR8 and identification of eleven DGCR8-associated proteins. *Exp Cell Res.* 10 déc 2007;313(20):4196-207.
523. Fukuda T, Yamagata K, Fujiyama S, Matsumoto T, Koshida I, Yoshimura K, et al. DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat Cell Biol.* mai 2007;9(5):604-11.
524. Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature.* 23 juill 2009;460(7254):529-33.
525. Sakamoto S, Aoki K, Higuchi T, Todaka H, Morisawa K, Tamaki N, et al. The NF90-NF45 complex functions as a negative regulator in the microRNA processing pathway. *Mol Cell Biol.* juill 2009;29(13):3754-69.

526. Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, et al. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science*. 27 nov 2009;326(5957):1275-9.
527. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 15 déc 2003;17(24):3011-6.
528. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. févr 2004;10(2):185-91.
529. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2 janv 2004;303(5654):95-8.
530. Zeng Y, Cullen BR. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(16):4776-85.
531. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*. 15 oct 2001;15(20):2654-9.
532. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*. 9 juill 2004;118(1):57-68.
533. Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, et al. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science*. 13 janv 2006;311(5758):195-8.
534. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 4 août 2005;436(7051):740-4.
535. Lee Y, Hur I, Park S-Y, Kim Y-K, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J*. 8 févr 2006;25(3):522-32.
536. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 17 oct 2003;115(2):209-16.
537. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 17 oct 2003;115(2):199-208.
538. Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W. Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res*. sept 2007;35(17):5944-53.
539. Okamura K, Liu N, Lai EC. Distinct mechanisms for microRNA strand selection by *Drosophila* Argonautes. *Mol Cell*. 13 nov 2009;36(3):431-44.
540. Kuchenbauer F, Mah SM, Heuser M, McPherson A, Rüschemann J, Rouhi A, et al. Comprehensive analysis of mammalian miRNA* species and their role in myeloid cells. *Blood*. 22 sept 2011;118(12):3350-8.
541. Biasiolo M, Sales G, Lionetti M, Agnelli L, Todoerti K, Bisognin A, et al. Impact of host genes and strand selection on miRNA and miRNA* expression. *PloS One*. 2011;6(8):e23854.

542. Yang J-S, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, Siepel AC, et al. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA*. févr 2011;17(2):312-26.
543. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. févr 2008;9(2):102-14.
544. Eystathiou T, Chan EKL, Tenenbaum SA, Keene JD, Griffith K, Fritzler MJ. A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell*. avr 2002;13(4):1338-51.
545. Ingelfinger D, Arndt-Jovin DJ, Lührmann R, Achsel T. The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci. *RNA*. déc 2002;8(12):1489-501.
546. van Dijk E, Cougot N, Meyer S, Babajko S, Wahle E, Séraphin B. Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J*. 16 déc 2002;21(24):6915-24.
547. Eystathiou T, Jakymiw A, Chan EKL, Séraphin B, Cougot N, Fritzler MJ. The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA*. oct 2003;9(10):1171-3.
548. Sheth U, Parker R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*. 2 mai 2003;300(5620):805-8.
549. Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev*. 15 juill 2006;20(14):1885-98.
550. Till S, Lejeune E, Thermann R, Bortfeld M, Hothorn M, Enderle D, et al. A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nat Struct Mol Biol*. oct 2007;14(10):897-903.
551. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol*. avr 2008;15(4):346-53.
552. Lian SL, Li S, Abadal GX, Pauley BA, Fritzler MJ, Chan EKL. The C-terminal half of human Ago2 binds to multiple GW-rich regions of GW182 and requires GW182 to mediate silencing. *RNA*. mai 2009;15(5):804-13.
553. Takimoto K, Wakiyama M, Yokoyama S. Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. *RNA*. juin 2009;15(6):1078-89.
554. Lazzaretti D, Tournier I, Izaurralde E. The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins. *RNA*. juin 2009;15(6):1059-66.
555. Zipprich JT, Bhattacharyya S, Mathys H, Filipowicz W. Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *RNA*. mai 2009;15(5):781-93.

556. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song J-J, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 3 sept 2004;305(5689):1437-41.
557. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*. 23 juill 2004;15(2):185-97.
558. Su H, Trombly MI, Chen J, Wang X. Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. *Genes Dev*. 1 févr 2009;23(3):304-17.
559. Song J-J, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen RA, et al. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol*. déc 2003;10(12):1026-32.
560. Yan KS, Yan S, Farooq A, Han A, Zeng L, Zhou M-M. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*. 27 nov 2003;426(6965):468-74.
561. Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M. Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat Struct Mol Biol*. juin 2004;11(6):576-7.
562. Ma J-B, Yuan Y-R, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*. 31 mars 2005;434(7033):666-70.
563. Parker JS, Roe SM, Barford D. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature*. 31 mars 2005;434(7033):663-6.
564. Song J-J, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*. 3 sept 2004;305(5689):1434-7.
565. Yuan Y-R, Pei Y, Ma J-B, Kuryavyi V, Zhadina M, Meister G, et al. Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell*. 5 août 2005;19(3):405-19.
566. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev*. 15 mars 2002;16(6):720-8.
567. Salzman DW, Shubert-Coleman J, Furneaux H. P68 RNA helicase unwinds the human let-7 microRNA precursor duplex and is required for let-7-directed silencing of gene expression. *J Biol Chem*. 9 nov 2007;282(45):32773-9.
568. Meister G, Landthaler M, Peters L, Chen PY, Urlaub H, Lührmann R, et al. Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol CB*. 6 déc 2005;15(23):2149-55.
569. Robb GB, Rana TM. RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Mol Cell*. 25 mai 2007;26(4):523-37.
570. Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, et al. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*. 15 avr 2003;17(8):991-1008.
571. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*. 1 mars 2004;18(5):504-11.

572. Kloosterman WP, Wienholds E, Ketting RF, Plasterk RHA. Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(21):6284-91.
573. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of MicroRNA–Target Recognition. *PLoS Biol.* 15 févr 2005;3(3):e85.
574. Yekta S, Shih I-H, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science.* 23 avr 2004;304(5670):594-6.
575. Davis E, Caiment F, Tordo X, Cavallé J, Ferguson-Smith A, Cockett N, et al. RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted Rtl1/Peg11 locus. *Curr Biol CB.* 26 avr 2005;15(8):743-9.
576. Shin C, Nam J-W, Farh KK-H, Chiang HR, Shkumatava A, Bartel DP. Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Mol Cell.* 25 juin 2010;38(6):789-802.
577. Grimson A, Farh KK-H, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell.* 6 juill 2007;27(1):91-105.
578. Lewis BP, Shih I -hun., Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell.* 26 déc 2003;115(7):787-98.
579. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol.* nov 2004;2(11):e363.
580. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* mai 2005;37(5):495-500.
581. Peric D. Etude fonctionnelle de la voie micro-ARN dans la biologie des cellules tumorales. [Fontenay-aux-Roses]: Paris XI; 2012.
582. Broderick JA, Salomon WE, Ryder SP, Aronin N, Zamore PD. Argonaute protein identity and pairing geometry determine cooperativity in mammalian RNA silencing. *RNA.* oct 2011;17(10):1858-69.
583. Sætrom P, Heale BSE, Snøve O, Aagaard L, Alluin J, Rossi JJ. Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Res.* avr 2007;35(7):2333-42.
584. Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, et al. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.* 17 déc 2008;27(24):3300-10.
585. Tsai N-P, Lin Y-L, Wei L-N. MicroRNA mir-346 targets the 5'-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression. *Biochem J.* 10 déc 2009;424(3):411-8.
586. Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell.* 23 mai 2008;30(4):460-71.
587. Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell.* 16 juin 2006;125(6):1111-24.

588. Ameres SL, Martinez J, Schroeder R. Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell*. 13 juill 2007;130(1):101-12.
589. Kedde M, Strasser MJ, Boldajipour B, Oude Vrielink JAF, Slanchev K, le Sage C, et al. RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell*. 28 déc 2007;131(7):1273-86.
590. Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet*. oct 2007;39(10):1278-84.
591. Glorian V, Maillot G, Polès S, Iacovoni JS, Favre G, Vagner S. HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. nov 2011;18(11):1692-701.
592. Vella MC, Choi E-Y, Lin S-Y, Reinert K, Slack FJ. The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes Dev*. 15 janv 2004;18(2):132-7.
593. Didiano D, Hobert O. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nat Struct Mol Biol*. sept 2006;13(9):849-51.
594. Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R, Hornstein E, Kitzman J, Burge CB. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA*. nov 2007;13(11):1894-910.
595. Sun G, Li H, Rossi JJ. Sequence context outside the target region influences the effectiveness of miR-223 target sites in the RhoB 3'UTR. *Nucleic Acids Res*. janv 2010;38(1):239-52.
596. Ivanovska I, Ball AS, Diaz RL, Magnus JF, Kibukawa M, Schelter JM, et al. MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression. *Mol Cell Biol*. avr 2008;28(7):2167-74.
597. Wu S, Huang S, Ding J, Zhao Y, Liang L, Liu T, et al. Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. *Oncogene*. 15 avr 2010;29(15):2302-8.
598. Petrocca F, Visone R, Onelli MR, Shah MH, Nicoloso MS, de Martino I, et al. E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell*. mars 2008;13(3):272-86.
599. Peter ME. Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step. *Oncogene*. 15 avr 2010;29(15):2161-4.
600. Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell*. 5 août 2011;146(3):353-8.
601. Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. févr 2010;11(2):113-27.
602. Gomez IG, MacKenna DA, Johnson BG, Kaimal V, Roach AM, Ren S, et al. Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways. *J Clin Invest*. janv 2015;125(1):141-56.

603. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*. 2 sept 2005;309(5740):1573-6.
604. Humphreys DT, Westman BJ, Martin DIK, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 nov 2005;102(47):16961-6.
605. Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, et al. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*. 21 sept 2007;317(5845):1764-7.
606. Seggerson K, Tang L, Moss EG. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol*. 15 mars 2002;243(2):215-25.
607. Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol*. déc 2006;13(12):1102-7.
608. Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol*. déc 2006;13(12):1108-14.
609. Petersen CP, Bordeleau M-E, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*. 17 févr 2006;21(4):533-42.
610. Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet TIG*. mai 2007;23(5):243-9.
611. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 17 févr 2005;433(7027):769-73.
612. Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*. 26 août 2005;122(4):553-63.
613. Rehwinkel J, Natalin P, Stark A, Brennecke J, Cohen SM, Izaurralde E. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by Drosha and Argonaute proteins in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*. avr 2006;26(8):2965-75.
614. Schmitter D, Filkowski J, Sewer A, Pillai RS, Oakeley EJ, Zavolan M, et al. Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(17):4801-15.
615. Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. janv 2007;8(1):9-22.
616. Chu C, Rana TM. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol*. juill 2006;4(7):e210.
617. Sen GL, Blau HM. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol*. juin 2005;7(6):633-6.
618. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*. juill 2005;7(7):719-23.

619. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* 1 mars 2006;20(5):515-24.
620. Brengues M, Teixeira D, Parker R. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science.* 21 oct 2005;310(5747):486-9.
621. Leung AKL, Calabrese JM, Sharp PA. Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28 nov 2006;103(48):18125-30.
622. Nelson PT, Hatzigeorgiou AG, Mourelatos Z. miRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line. *RNA.* mars 2004;10(3):387-94.
623. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science.* 10 août 2001;293(5532):1146-50.
624. Caudy AA, Ketting RF, Hammond SM, Denli AM, Bathoorn AMP, Tops BBJ, et al. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature.* sept 2003;425(6956):411-4.
625. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* oct 2008;18(10):997-1006.
626. Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence.* 1 mars 2010;1(1):7.
627. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 sept 2009;15(17):5473-7.
628. Liang H, Gong F, Zhang S, Zhang C-Y, Zen K, Chen X. The origin, function, and diagnostic potential of extracellular microRNAs in human body fluids. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* avr 2014;5(2):285-300.
629. Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol.* déc 2010;28(6):655-61.
630. Stamatopoulos B, Van Damme M, Crompton E, Dessars B, El Housni H, Mineur P, et al. Opposite prognostic significance of cellular and serum circulating microRNA-150 in Chronic Lymphocytic Leukemia patients. *Mol Med Camb Mass.* 9 janv 2015;
631. Ng EKO, Chong WWS, Jin H, Lam EKY, Shin VY, Yu J, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut.* oct 2009;58(10):1375-81.
632. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci.* nov 2012;37(11):460-5.
633. Laterza OF, Lim L, Garrett-Engele PW, Vlasakova K, Muniappa N, Tanaka WK, et al. Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem.* nov 2009;55(11):1977-83.

634. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* déc 2008;10(12):1470-6.
635. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* août 2002;2(8):569-79.
636. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* févr 2009;19(2):43-51.
637. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell.* 9 juill 2010;39(1):133-44.
638. Li L, Zhu D, Huang L, Zhang J, Bian Z, Chen X, et al. Argonaute 2 Complexes Selectively Protect the Circulating MicroRNAs in Cell-Secreted Microvesicles. *PLoS ONE.* 15 oct 2012;7(10):e46957.
639. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* avr 2011;13(4):423-33.
640. Janas T, Janas T, Yarus M. Specific RNA binding to ordered phospholipid bilayers. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(7):2128-36.
641. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22 mars 2011;108(12):5003-8.
642. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 1 sept 2011;39(16):7223-33.
643. Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell.* 10 févr 1989;56(3):379-90.
644. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol CB.* 30 avr 2002;12(9):735-9.
645. Babak T, Zhang W, Morris Q, Blencowe BJ, Hughes TR. Probing microRNAs with microarrays: Tissue specificity and functional inference. *RNA.* nov 2004;10(11):1813-9.
646. Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol.* 2004;5(3):R13.
647. Deo M, Yu J-Y, Chung K-H, Tippens M, Turner DL. Detection of mammalian microRNA expression by in situ hybridization with RNA oligonucleotides. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* sept 2006;235(9):2538-48.
648. Strauss WM, Chen C, Lee C-T, Ridzon D. Nonrestrictive developmental regulation of microRNA gene expression. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc.* août 2006;17(8):833-40.

649. Beuvink I, Kolb FA, Budach W, Garnier A, Lange J, Natt F, et al. A novel microarray approach reveals new tissue-specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(7):e52.
650. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell.* 29 juin 2007;129(7):1401-14.
651. Wu H, Neilson JR, Kumar P, Manocha M, Shankar P, Sharp PA, et al. miRNA profiling of naïve, effector and memory CD8 T cells. *PLoS One.* 10 oct 2007;2(10):e1020.
652. Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA, Zhang Z, Dietrich FS, Tarakhovskiy A, et al. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat Genet.* mars 2006;38(3):356-62.
653. Boehm M, Slack F. A developmental timing microRNA and its target regulate life span in *C. elegans*. *Science.* 23 déc 2005;310(5756):1954-7.
654. Lin S-Y, Johnson SM, Abraham M, Vella MC, Pasquinelli A, Gamberi C, et al. The *C. elegans* hunchback homolog, hbl-1, controls temporal patterning and is a probable microRNA target. *Dev Cell.* mai 2003;4(5):639-50.
655. Wang D, Si S, Wang Q, Luo G, Du Q, Liang Q, et al. MiR-27a Promotes Hemin-Induced Erythroid Differentiation of K562 Cells by Targeting CDC25B. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2018;46(1):365-74.
656. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature.* 11 nov 2004;432(7014):226-30.
657. Smirnova L, Gräfe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci.* mars 2005;21(6):1469-77.
658. Visvanathan J, Lee S, Lee B, Lee JW, Lee S-K. The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev.* 1 avr 2007;21(7):744-9.
659. Chen Q, Xu J, Li L, Li H, Mao S, Zhang F, et al. MicroRNA-23a/b and microRNA-27a/b suppress Apaf-1 protein and alleviate hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Cell Death Dis.* mars 2014;5(3):e1132.
660. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell.* août 2008;15(2):261-71.
661. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh R-F, Wythe JD, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell.* août 2008;15(2):272-84.
662. Yu Z, Raabe T, Hecht NB. MicroRNA Mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage. *Biol Reprod.* sept 2005;73(3):427-33.
663. Tang F, Kaneda M, O'Carroll D, Hajkova P, Barton SC, Sun YA, et al. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev.* 15 mars 2007;21(6):644-8.

664. Tesfaye D, Worku D, Rings F, Phatsara C, Tholen E, Schellander K, et al. Identification and expression profiling of microRNAs during bovine oocyte maturation using heterologous approach. *Mol Reprod Dev.* juill 2009;76(7):665-77.
665. Cheng Y, Liu X, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. MicroRNA-21 protects against the H₂O₂-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. *J Mol Cell Cardiol.* juill 2009;47(1):5-14.
666. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature.* 18 déc 2008;456(7224):980-4.
667. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26 nov 2002;99(24):15524-9.
668. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev.* déc 2009;28(3-4):369-78.
669. Chang T-C, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell.* 8 juin 2007;26(5):745-52.
670. Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Körner H, et al. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle Georget Tex.* 15 août 2008;7(16):2591-600.
671. Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA: implications for cancer. *Virchows Arch Int J Pathol.* janv 2008;452(1):1-10.
672. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 11 mars 2005;120(5):635-47.
673. Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol.* mars 2010;12(3):247-56.
674. Ovcharenko D, Kelnar K, Johnson C, Leng N, Brown D. Genome-scale microRNA and small interfering RNA screens identify small RNA modulators of TRAIL-induced apoptosis pathway. *Cancer Res.* 15 nov 2007;67(22):10782-8.
675. Ji J, Shi J, Budhu A, Yu Z, Forgues M, Roessler S, et al. MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. *N Engl J Med.* 8 oct 2009;361(15):1437-47.
676. Xia L, Zhang D, Du R, Pan Y, Zhao L, Sun S, et al. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells. *Int J Cancer.* 15 juill 2008;123(2):372-9.
677. Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol.* févr 2010;11(2):136-46.
678. Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* in health and disease. *Gastroenterology.* mai 2009;136(6):1863-73.

679. Polk DB, Peek RM. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nat Rev Cancer*. juin 2010;10(6):403-14.
680. Fassan M, Saraggi D, Balsamo L, Cascione L, Castoro C, Coati I, et al. Let-7c down-regulation in *Helicobacter pylori*-related gastric carcinogenesis. *Oncotarget*. 17 déc 2015;7(4):4915-24.
681. Tang B, Li N, Gu J, Zhuang Y, Li Q, Wang H-G, et al. Compromised autophagy by MIR30B benefits the intracellular survival of *Helicobacter pylori*. *Autophagy*. 1 juill 2012;8(7):1045-57.
682. Kiga K, Mimuro H, Suzuki M, Shinozaki-Ushiku A, Kobayashi T, Sanada T, et al. Epigenetic silencing of miR-210 increases the proliferation of gastric epithelium during chronic *Helicobacter pylori* infection. *Nat Commun*. 4 sept 2014;5:4497.
683. Zhang Y-M, Noto JM, Hammond CE, Barth JL, Argraves WS, Backert S, et al. *Helicobacter pylori*-induced posttranscriptional regulation of H-K-ATPase α -subunit gene expression by miRNA. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1 avr 2014;306(7):G606-613.
684. Xie G, Li W, Li R, Wu K, Zhao E, Zhang Y, et al. *Helicobacter Pylori* Promote B7-H1 Expression by Suppressing miR-152 and miR-200b in Gastric Cancer Cells. *PLoS One*. 2017;12(1):e0168822.
685. Koch M, Mollenkopf H-J, Klemm U, Meyer TF. Induction of microRNA-155 is TLR- and type IV secretion system-dependent in macrophages and inhibits DNA-damage induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 mai 2012;109(19):E1153-1162.
686. Xiao B, Liu Z, Li B-S, Tang B, Li W, Guo G, et al. Induction of microRNA-155 during *Helicobacter pylori* infection and its negative regulatory role in the inflammatory response. *J Infect Dis*. 15 sept 2009;200(6):916-25.
687. Hocès de la Guardia A, Staedel C, Kaafarany I, Clément A, Roubaud Baudron C, Mégraud F, et al. Inflammatory cytokine and microRNA responses of primary human dendritic cells cultured with *Helicobacter pylori* strains. *Front Microbiol*. 2013;4:236.
688. Liu Z, Wang D, Hu Y, Zhou G, Zhu C, Yu Q, et al. MicroRNA-146a negatively regulates PTGS2 expression induced by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells. *J Gastroenterol*. janv 2013;48(1):86-92.
689. Saito Y, Suzuki H, Hibi T. The role of microRNAs in gastrointestinal cancers. *J Gastroenterol*. 2009;44 Suppl 19:18-22.
690. Koch M, Mollenkopf H-J, Klemm U, Meyer TF. Induction of microRNA-155 is TLR- and type IV secretion system-dependent in macrophages and inhibits DNA-damage induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 mai 2012;109(19):E1153-1162.
691. Fassi Fehri L, Koch M, Belogolova E, Khalil H, Bolz C, Kalali B, et al. *Helicobacter pylori* Induces miR-155 in T Cells in a cAMP-Foxp3-Dependent Manner. *PLoS ONE*. 2010;5(3).
692. Oertli M, Engler DB, Kohler E, Koch M, Meyer TF, Müller A. MicroRNA-155 is essential for the T cell-mediated control of *Helicobacter pylori* infection and for the induction of chronic Gastritis and Colitis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 oct 2011;187(7):3578-86.
693. Liu Z, Xiao B, Tang B, Li B, Li N, Zhu E, et al. Up-regulated microRNA-146a negatively modulate *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response in human gastric epithelial cells. *Microbes Infect*. oct 2010;12(11):854-63.

694. Li N, Xu X, Xiao B, Zhu E-D, Li B, Liu Z, et al. *H. pylori* related proinflammatory cytokines contribute to the induction of miR-146a in human gastric epithelial cells. *Mol Biol Rep.* 1 avr 2012;39(4):4655-61.
695. Gunn JS. Salmonella Host–Pathogen Interactions: A Special Topic. *Front Microbiol.* 19 sept 2011;2.
696. Malik-Kale P, Jolly CE, Lathrop S, Winfree S, Luterbach C, Steele-Mortimer O. *Salmonella* - at home in the host cell. *Front Microbiol.* 2011;2:125.
697. Hoeke L, Sharbati J, Pawar K, Keller A, Einspanier R, Sharbati S. Intestinal *Salmonella typhimurium* infection leads to miR-29a induced caveolin 2 regulation. *PloS One.* 2013;8(6):e67300.
698. Schulte LN, Eulalio A, Mollenkopf H-J, Reinhardt R, Vogel J. Analysis of the host microRNA response to *Salmonella* uncovers the control of major cytokines by the let-7 family. *EMBO J.* 18 mai 2011;30(10):1977-89.
699. Ordas A, Kanwal Z, Lindenberg V, Rougeot J, Mink M, Spaink HP, et al. MicroRNA-146 function in the innate immune transcriptome response of zebrafish embryos to *Salmonella typhimurium* infection. *BMC Genomics.* 10 oct 2013;14:696.
700. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science.* 27 avr 2007;316(5824):608-11.
701. Zhang T, Yu J, Zhang Y, Li L, Chen Y, Li D, et al. *Salmonella enterica* serovar enteritidis modulates intestinal epithelial miR-128 levels to decrease macrophage recruitment via macrophage colony-stimulating factor. *J Infect Dis.* 15 juin 2014;209(12):2000-11.
702. Zhou X, Ye Y, Sun Y, Li X, Wang W, Privratsky B, et al. Transient Receptor Potential Channel 1 Deficiency Impairs Host Defense and Proinflammatory Responses to Bacterial Infection by Regulating Protein Kinase Ca Signaling. *Mol Cell Biol.* août 2015;35(16):2729-39.
703. Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* août 2010;10(4):441-51.
704. Zhou X, Li X, Ye Y, Zhao K, Zhuang Y, Li Y, et al. MicroRNA-302b augments host defense to bacteria by regulating inflammatory responses via feedback to TLR/IRAK4 circuits. *Nat Commun.* 10 avr 2014;5:3619.
705. Li X, He S, Li R, Zhou X, Zhang S, Yu M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection augments inflammation through miR-301b repression of c-Myb-mediated immune activation and infiltration. *Nat Microbiol.* 08 2016;1(10):16132.
706. Mun J, Tam C, Chan G, Kim JH, Evans D, Fleiszig S. MicroRNA-762 is upregulated in human corneal epithelial cells in response to tear fluid and *Pseudomonas aeruginosa* antigens and negatively regulates the expression of host defense genes encoding RNase7 and ST2. *PloS One.* 2013;8(2):e57850.
707. Yang K, Wu M, Li M, Li D, Peng A, Nie X, et al. miR-155 suppresses bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa*-induced keratitis by targeting Rheb. *J Infect Dis.* 1 juill 2014;210(1):89-98.

708. Maudet C, Mano M, Eulalio A. MicroRNAs in the interaction between host and bacterial pathogens. *FEBS Lett.* 17 nov 2014;588(22):4140-7.
709. Kim JK, Kim TS, Basu J, Jo E-K. MicroRNA in innate immunity and autophagy during mycobacterial infection. *Cell Microbiol.* 2017;19(1).
710. Dorhoi A, Iannaccone M, Farinacci M, Faé KC, Schreiber J, Moura-Alves P, et al. MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment. *J Clin Invest.* nov 2013;123(11):4836-48.
711. Singh Y, Kaul V, Mehra A, Chatterjee S, Tousif S, Dwivedi VP, et al. *Mycobacterium tuberculosis* controls microRNA-99b (miR-99b) expression in infected murine dendritic cells to modulate host immunity. *J Biol Chem.* 15 févr 2013;288(7):5056-61.
712. Wang J, Yang K, Zhou L, Minhaowu null, Wu Y, Zhu M, et al. MicroRNA-155 promotes autophagy to eliminate intracellular mycobacteria by targeting Rheb. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003697.
713. Wang J, Wu M, Wen J, Yang K, Li M, Zhan X, et al. MicroRNA-155 induction by *Mycobacterium bovis* BCG enhances ROS production through targeting SHIP1. *Mol Immunol.* nov 2014;62(1):29-36.
714. Iwai H, Funatogawa K, Matsumura K, Kato-Miyazawa M, Kirikae F, Kiga K, et al. MicroRNA-155 knockout mice are susceptible to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberc Edinb Scotl.* mai 2015;95(3):246-50.
715. Kumar R, Halder P, Sahu SK, Kumar M, Kumari M, Jana K, et al. Identification of a novel role of ESAT-6-dependent miR-155 induction during infection of macrophages with *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol.* oct 2012;14(10):1620-31.
716. Siddle KJ, Tailleux L, Deschamps M, Loh Y-HE, Deluen C, Gicquel B, et al. Bacterial infection drives the expression dynamics of microRNAs and their isomiRs. *PLoS Genet.* mars 2015;11(3):e1005064.
717. Sahu SK, Kumar M, Chakraborty S, Banerjee SK, Kumar R, Gupta P, et al. MicroRNA 26a (miR-26a)/KLF4 and CREB-C/EBP β regulate innate immune signaling, the polarization of macrophages and the trafficking of *Mycobacterium tuberculosis* to lysosomes during infection. *PLoS Pathog.* mai 2017;13(5):e1006410.
718. Kim JK, Yuk J-M, Kim SY, Kim TS, Jin HS, Yang C-S, et al. MicroRNA-125a Inhibits Autophagy Activation and Antimicrobial Responses during Mycobacterial Infection. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 juin 2015;194(11):5355-65.
719. Xue X, Qiu Y, Yang H-L. Immunoregulatory Role of MicroRNA-21 in Macrophages in Response to *Bacillus Calmette-Guerin* Infection Involves Modulation of the TLR4/MyD88 Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2017;42(1):91-102.
720. Li M, Wang J, Fang Y, Gong S, Li M, Wu M, et al. microRNA-146a promotes mycobacterial survival in macrophages through suppressing nitric oxide production. *Sci Rep.* 30 mars 2016;6:23351.

721. Liu Z, Zhou G, Deng X, Yu Q, Hu Y, Sun H, et al. Analysis of miRNA expression profiling in human macrophages responding to *Mycobacterium* infection: induction of the immune regulator miR-146a. *J Infect.* juin 2014;68(6):553-61.
722. Izar B, Mannala GK, Mraheil MA, Chakraborty T, Hain T. microRNA Response to *Listeria monocytogenes* Infection in Epithelial Cells. *Int J Mol Sci.* 20 janv 2012;13(1):1173-85.
723. Lind EF, Elford AR, Ohashi PS. Micro-RNA 155 is required for optimal CD8+ T cell responses to acute viral and intracellular bacterial challenges. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 févr 2013;190(3):1210-6.
724. Moon H-G, Yang J, Zheng Y, Jin Y. miR-15a/16 regulates macrophage phagocytosis after bacterial infection. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 nov 2014;193(9):4558-67.
725. Kalantari P, Harandi OF, Agarwal S, Rus F, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA, et al. miR-718 represses proinflammatory cytokine production through targeting phosphatase and tensin homolog (PTEN). *J Biol Chem.* 07 2017;292(14):5634-44.
726. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of *hepatitis C* virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science.* 2 sept 2005;309(5740):1577-81.
727. Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM. Masking the 5' terminal nucleotides of the *hepatitis C* virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22 févr 2011;108(8):3193-8.
728. Shimakami T, Yamane D, Jangra RK, Kempf BJ, Spaniel C, Barton DJ, et al. Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 janv 2012;109(3):941-6.
729. Li Y, Yamane D, Lemon SM. Dissecting the roles of the 5' exoribonucleases Xrn1 and Xrn2 in restricting hepatitis C virus replication. *J Virol.* mai 2015;89(9):4857-65.
730. Girardi E, López P, Pfeffer S. On the Importance of Host MicroRNAs During Viral Infection. *Front Genet.* 2 oct 2018;9.
731. Lodge R, Ferreira Barbosa JA, Lombard-Vadnais F, Gilmore JC, Deshiere A, Gosselin A, et al. Host MicroRNAs-221 and -222 Inhibit HIV-1 Entry in Macrophages by Targeting the CD4 Viral Receptor. *Cell Rep.* 3 oct 2017;21(1):141-53.
732. Quaranta MT, Olivetta E, Sanchez M, Spinello I, Paolillo R, Arenaccio C, et al. miR-146a controls CXCR4 expression in a pathway that involves PLZF and can be used to inhibit HIV-1 infection of CD4(+) T lymphocytes. *Virology.* avr 2015;478:27-38.
733. Shim B-S, Wu W, Kyriakis CS, Bakre A, Jorquera PA, Perwitasari O, et al. MicroRNA-555 has potent antiviral properties against poliovirus. *J Gen Virol.* mars 2016;97(3):659-68.
734. Kincaid RP, Sullivan CS. Virus-Encoded microRNAs: An Overview and a Look to the Future. *PLoS Pathog.* 20 déc 2012;8(12).
735. Tahamtan A, Teymoori-Rad M, Nakstad B, Salimi V. Anti-Inflammatory MicroRNAs and Their Potential for Inflammatory Diseases Treatment. *Front Immunol.* 2018;9:1377.

736. Foster PS, Plank M, Collison A, Tay HL, Kaiko GE, Li J, et al. The emerging role of microRNAs in regulating immune and inflammatory responses in the lung. *Immunol Rev.* mai 2013;253(1):198-215.
737. Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Trends Immunol.* juill 2008;29(7):343-51.
738. Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol.* août 2008;9(8):839-45.
739. Mehta A, Baltimore D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. *Nat Rev Immunol.* 28 2016;16(5):279-94.
740. Tahamtan A, Inchley CS, Marzban M, Tavakoli-Yaraki M, Teymoori-Rad M, Nakstad B, et al. The role of microRNAs in respiratory viral infection: friend or foe? *Rev Med Virol.* 2016;26(6):389-407.
741. O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* mars 2011;11(3):163-75.
742. Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, Yang L, Zhao JL, Kalwani M, et al. miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med.* 6 juin 2011;208(6):1189-201.
743. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature.* 28 févr 2008;451(7182):1125-9.
744. Perry MM, Moschos SA, Williams AE, Shepherd NJ, Larner-Svensson HM, Lindsay MA. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the interleukin-1 β induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 avr 2008;180(8):5689-98.
745. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 janv 2007;104(5):1604-9.
746. Smyth LA, Boardman DA, Tung SL, Lechler R, Lombardi G. MicroRNAs affect dendritic cell function and phenotype. *Immunology.* févr 2015;144(2):197-205.
747. Beaulieu AM, Bezman NA, Lee JE, Matloubian M, Sun JC, Lanier LL. MicroRNA function in NK-cell biology. *Immunol Rev.* mai 2013;253(1):40-52.
748. Cobb BS, Nesterova TB, Thompson E, Hertweck A, O'Connor E, Godwin J, et al. T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *J Exp Med.* 2 mai 2005;201(9):1367-73.
749. Liang Y, Pan H-F, Ye D-Q. microRNAs function in CD8+T cell biology. *J Leukoc Biol.* mars 2015;97(3):487-97.
750. Zhou X, Jeker LT, Fife BT, Zhu S, Anderson MS, McManus MT, et al. Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *J Exp Med.* 1 sept 2008;205(9):1983-91.

751. Thai T-H, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*. 27 avr 2007;316(5824):604-8.
752. Koralov SB, Muljo SA, Galler GR, Krek A, Chakraborty T, Kanellopoulou C, et al. Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell*. 7 mars 2008;132(5):860-74.
753. Garo LP, Murugaiyan G. Contribution of MicroRNAs to autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci CMLS*. mai 2016;73(10):2041-51.
754. Belder L, de Yébenes VG, Ramiro AR. MicroRNAs prevent the generation of autoreactive antibodies. *Immunity*. 24 nov 2010;33(5):713-22.
755. Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell*. 9 janv 2009;136(1):26-36.
756. Li Q-J, Chau J, Ebert PJR, Sylvester G, Min H, Liu G, et al. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell*. 6 avr 2007;129(1):147-61.
757. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 19 déc 2002;420(6917):846-52.
758. Salimi V, Ramezani A, Mirzaei H, Tahamtan A, Faghihloo E, Rezaei F, et al. Evaluation of the expression level of 12/15 lipoxygenase and the related inflammatory factors (CCL5, CCL3) in respiratory syncytial virus infection in mice model. *Microb Pathog*. août 2017;109:209-13.
759. Tahamtan A, Tavakoli-Yaraki M, Mokhtari-Azad T, Teymoori-Rad M, Bont L, Shokri F, et al. Opioids and Viral Infections: A Double-Edged Sword. *Front Microbiol*. 22 juin 2016;7.
760. Tahamtan A, Tavakoli-Yaraki M, Rygiel TP, Mokhtari-Azad T, Salimi V. Effects of cannabinoids and their receptors on viral infections. *J Med Virol*. janv 2016;88(1):1-12.
761. O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:295-312.
762. Alam MM, O'Neill LA. MicroRNAs and the resolution phase of inflammation in macrophages. *Eur J Immunol*. sept 2011;41(9):2482-5.
763. Fornari TA, Donate PB, Assis AF, Macedo C, Sakamoto-Hojo ET, Donadi EA, et al. Comprehensive Survey of miRNA-mRNA Interactions Reveals That Ccr7 and Cd247 (CD3 zeta) are Posttranscriptionally Controlled in Pancreas Infiltrating T Lymphocytes of Non-Obese Diabetic (NOD) Mice. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142688.
764. Takahashi P, Xavier DJ, Evangelista AF, Manoel-Caetano FS, Macedo C, Collares CVA, et al. MicroRNA expression profiling and functional annotation analysis of their targets in patients with type 1 diabetes mellitus. *Gene*. 15 avr 2014;539(2):213-23.
765. Fang Y, Shi C, Manduchi E, Civelek M, Davies PF. MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in athero-susceptible endothelium in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 juill 2010;107(30):13450-5.
766. Xue X, Feng T, Yao S, Wolf KJ, Liu C-G, Liu X, et al. Microbiota downregulates dendritic cell expression of miR-10a, which targets IL-12/IL-23p40. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 déc 2011;187(11):5879-86.

767. Liu P, Xia L, Zhang W-L, Ke H-J, Su T, Deng L-B, et al. Identification of serum microRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for acute pancreatitis. *Pancreatol Off J Int Assoc Pancreatol IAP Al.* juin 2014;14(3):159-66.
768. Wu W, He C, Liu C, Cao AT, Xue X, Evans-Marin HL, et al. miR-10a inhibits dendritic cell activation and Th1/Th17 cell immune responses in IBD. *Gut.* nov 2015;64(11):1755-64.
769. Mu N, Gu J, Huang T, Zhang C, Shu Z, Li M, et al. A novel NF- κ B/YY1/microRNA-10a regulatory circuit in fibroblast-like synoviocytes regulates inflammation in rheumatoid arthritis. *Sci Rep.* 29 janv 2016;6:20059.
770. Liu G, Abraham E. MicroRNAs in immune response and macrophage polarization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* févr 2013;33(2):170-7.
771. Contreras J, Rao DS. MicroRNAs in inflammation and immune responses. *Leukemia.* mars 2012;26(3):404-13.
772. Li Y, Shi X. MicroRNAs in the regulation of TLR and RIG-I pathways. *Cell Mol Immunol.* janv 2013;10(1):65-71.
773. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 août 2006;103(33):12481-6.
774. Androulidaki A, Iliopoulos D, Arranz A, Doxaki C, Schworer S, Zacharioudaki V, et al. The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity.* 21 août 2009;31(2):220-31.
775. Ceppi M, Pereira PM, Dunand-Sauthier I, Barras E, Reith W, Santos MA, et al. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24 févr 2009;106(8):2735-40.
776. Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, Gaudiosi D, Mirolo M, Mori L, et al. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc Natl Acad Sci.* 16 mars 2009;pnas.0810909106.
777. Ma X, Becker Buscaglia LE, Barker JR, Li Y. MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *J Mol Cell Biol.* juin 2011;3(3):159-66.
778. Cameron JE, Yin Q, Fewell C, Lacey M, McBride J, Wang X, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways. *J Virol.* févr 2008;82(4):1946-58.
779. Gatto G, Rossi A, Rossi D, Kroening S, Bonatti S, Mallardo M. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 trans-activates miR-155 transcription through the NF- κ B pathway. *Nucleic Acids Res.* nov 2008;36(20):6608-19.
780. Cheng Y, Kuang W, Hao Y, Zhang D, Lei M, Du L, et al. Downregulation of miR-27a* and miR-532-5p and upregulation of miR-146a and miR-155 in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells. *Inflammation.* août 2012;35(4):1308-13.

781. Shaked I, Meerson A, Wolf Y, Avni R, Greenberg D, Gilboa-Geffen A, et al. MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. *Immunity*. 18 déc 2009;31(6):965-73.
782. Lagos D, Pollara G, Henderson S, Gratrix F, Fabani M, Milne RSB, et al. miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. *Nat Cell Biol*. mai 2010;12(5):513-9.
783. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Park Y-J, Tsuruta Y, Abraham E. miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 sept 2009;106(37):15819-24.
784. Jennewein C, von Knethen A, Schmid T, Brüne B. MicroRNA-27b contributes to lipopolysaccharide-mediated peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mRNA destabilization. *J Biol Chem*. 16 avr 2010;285(16):11846-53.
785. Lu Z, Li Y, Takwi A, Li B, Zhang J, Conklin DJ, et al. miR-301a as an NF- κ B activator in pancreatic cancer cells. *EMBO J*. 5 janv 2011;30(1):57-67.
786. Chen X-M, Splinter PL, O'Hara SP, LaRusso NF. A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *J Biol Chem*. 28 sept 2007;282(39):28929-38.
787. O'Hara SP, Splinter PL, Gajdos GB, Trussoni CE, Fernandez-Zapico ME, Chen X-M, et al. NF κ B p50-CCAAT/Enhancer-binding Protein β (C/EBP β)-mediated Transcriptional Repression of MicroRNA let-7i following Microbial Infection. *J Biol Chem*. 1 janv 2010;285(1):216-25.
788. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell*. 13 nov 2009;139(4):693-706.
789. Hu G, Zhou R, Liu J, Gong A-Y, Eischeid AN, Dittman JW, et al. MicroRNA-98 and let-7 confer cholangiocyte expression of cytokine-inducible Src homology 2-containing protein in response to microbial challenge. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 août 2009;183(3):1617-24.
790. Wang H, Garzon R, Sun H, Ladner KJ, Singh R, Dahlman J, et al. NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell*. 4 nov 2008;14(5):369-81.
791. Foley NH, O'Neill LA. miR-107: a toll-like receptor-regulated miRNA dysregulated in obesity and type II diabetes. *J Leukoc Biol*. sept 2012;92(3):521-7.
792. Fujita S, Ito T, Mizutani T, Minoguchi S, Yamamichi N, Sakurai K, et al. miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J Mol Biol*. 2 mai 2008;378(3):492-504.
793. Misawa A, Katayama R, Koike S, Tomida A, Watanabe T, Fujita N. AP-1-Dependent miR-21 expression contributes to chemoresistance in cancer stem cell-like SP cells. *Oncol Res*. 2010;19(1):23-33.
794. Kutty RK, Nagineni CN, Samuel W, Vijayasarathy C, Jaworski C, Duncan T, et al. Differential regulation of microRNA-146a and microRNA-146b-5p in human retinal pigment epithelial cells by interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , and interferon- γ . *Mol Vis*. 2013;19:737-50.

795. Oneyama C, Ikeda J, Okuzaki D, Suzuki K, Kanou T, Shintani Y, et al. MicroRNA-mediated downregulation of mTOR/FGFR3 controls tumor growth induced by Src-related oncogenic pathways. *Oncogene*. 11 août 2011;30(32):3489-501.
796. Lin L, Hou J, Ma F, Wang P, Liu X, Li N, et al. Type I IFN inhibits innate IL-10 production in macrophages through histone deacetylase 11 by downregulating microRNA-145. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 oct 2013;191(7):3896-904.
797. Coll RC, O'Neill LAJ. New insights into the regulation of signalling by toll-like receptors and nod-like receptors. *J Innate Immun*. 2010;2(5):406-21.
798. He X, Jing Z, Cheng G. MicroRNAs: New Regulators of Toll-Like Receptor Signalling Pathways. *BioMed Res Int*. 20 mars 2014;2014:e945169.
799. Quinn EM, Wang JH, O'Callaghan G, Redmond HP. MicroRNA-146a Is Upregulated by and Negatively Regulates TLR2 Signaling. *PLoS ONE*. 29 avr 2013;8(4):e62232.
800. Yang K, He YS, Wang XQ, Lu L, Chen QJ, Liu J, et al. MiR-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting toll-like receptor 4. *FEBS Lett*. 23 mars 2011;585(6):854-60.
801. Jiang C, Zhu W, Xu J, Wang B, Hou W, Zhang R, et al. MicroRNA-26a negatively regulates toll-like receptor 3 expression of rat macrophages and ameliorates pristane induced arthritis in rats. *Arthritis Res Ther*. 14 janv 2014;16(1):R9.
802. Nahid MA, Satoh M, Chan EKL. Mechanistic role of microRNA-146a in endotoxin-induced differential cross-regulation of TLR signaling. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 févr 2011;186(3):1723-34.
803. Häslér R, Jacobs G, Till A, Grabe N, Cordes C, Nikolaus S, et al. Microbial pattern recognition causes distinct functional micro-RNA signatures in primary human monocytes. *PloS One*. 2012;7(2):e31151.
804. Broz P, Monack DM. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol*. août 2013;13(8):551-65.
805. Hou J, Wang P, Lin L, Liu X, Ma F, An H, et al. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 août 2009;183(3):2150-8.
806. Curtale G, Mirolo M, Renzi TA, Rossato M, Bazzoni F, Locati M. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10-dependent microRNA-146b. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 juill 2013;110(28):11499-504.
807. Nahid MA, Yao B, Dominguez-Gutierrez PR, Kesavalu L, Satoh M, Chan EKL. Regulation of TLR2-mediated tolerance and cross-tolerance through IRAK4 modulation by miR-132 and miR-212. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 févr 2013;190(3):1250-63.
808. Qi J, Qiao Y, Wang P, Li S, Zhao W, Gao C. microRNA-210 negatively regulates LPS-induced production of proinflammatory cytokines by targeting NF- κ B1 in murine macrophages. *FEBS Lett*. 24 avr 2012;586(8):1201-7.

809. Garg M, Potter JA, Abrahams VM. Identification of microRNAs that regulate TLR2-mediated trophoblast apoptosis and inhibition of IL-6 mRNA. *PLoS One*. 2013;8(10):e77249.
810. Chen Q, Wang H, Liu Y, Song Y, Lai L, Han Q, et al. Inducible MicroRNA-223 Down-Regulation Promotes TLR-Triggered IL-6 and IL-1 β Production in Macrophages by Targeting STAT3. *PLoS ONE*. 24 août 2012;7(8):e42971.
811. Asirvatham AJ, Magner WJ, Tomasi TB. miRNA regulation of cytokine genes. *Cytokine*. févr 2009;45(2):58-69.
812. Li Y, Fan X, He X, Sun H, Zou Z, Yuan H, et al. MicroRNA-466l inhibits antiviral innate immune response by targeting interferon-alpha. *Cell Mol Immunol*. nov 2012;9(6):497-502.
813. Witwer KW, Sisk JM, Gama L, Clements JE. MicroRNA regulation of IFN-beta protein expression: rapid and sensitive modulation of the innate immune response. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 mars 2010;184(5):2369-76.
814. Zhou R, O'Hara SP, Chen X-M. MicroRNA regulation of innate immune responses in epithelial cells. *Cell Mol Immunol*. sept 2011;8(5):371-9.
815. Wang P, Gu Y, Zhang Q, Han Y, Hou J, Lin L, et al. Identification of resting and type I IFN-activated human NK cell miRNomes reveals microRNA-378 and microRNA-30e as negative regulators of NK cell cytotoxicity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 juill 2012;189(1):211-21.
816. Tili E, Michaille J-J, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 oct 2007;179(8):5082-9.
817. Xu Z, Xiao S-B, Xu P, Xie Q, Cao L, Wang D, et al. miR-365, a novel negative regulator of interleukin-6 gene expression, is cooperatively regulated by Sp1 and NF-kappaB. *J Biol Chem*. 17 juin 2011;286(24):21401-12.
818. Sun Y, Varambally S, Maher CA, Cao Q, Chockley P, Toubai T, et al. Targeting of microRNA-142-3p in dendritic cells regulates endotoxin-induced mortality. *Blood*. 9 juin 2011;117(23):6172-83.
819. Palanisamy V, Jakymiw A, Van Tubergen EA, D'Silva NJ, Kirkwood KL. Control of cytokine mRNA expression by RNA-binding proteins and microRNAs. *J Dent Res*. juill 2012;91(7):651-8.
820. Stoecklin G, Tenenbaum SA, Mayo T, Chittur SV, George AD, Baroni TE, et al. Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraproline. *J Biol Chem*. 25 avr 2008;283(17):11689-99.
821. Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, et al. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell*. 11 mars 2005;120(5):623-34.
822. El Gazzar M, McCall CE. MicroRNAs distinguish translational from transcriptional silencing during endotoxin tolerance. *J Biol Chem*. 2 juill 2010;285(27):20940-51.
823. Bader AG, Brown D, Stoudemire J, Lammers P. Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Ther*. déc 2011;18(12):1121-6.

824. van Rooij E, Purcell AL, Levin AA. Developing microRNA therapeutics. *Circ Res.* 3 févr 2012;110(3):496-507.
825. Laitala-Leinonen T. Update on the development of microRNA and siRNA molecules as regulators of cell physiology. *Recent Pat DNA Gene Seq.* juin 2010;4(2):113-21.
826. McLeod BW, Hayman ML, Purcell AL, Marcus JS, Veitenheimer E. The « real world » utility of miRNA patents: lessons learned from expressed sequence tags. *Nat Biotechnol.* févr 2011;29(2):129-33.
827. Haussecker D. The business of RNAi therapeutics. *Hum Gene Ther.* mai 2008;19(5):451-62.
828. Haussecker D. The Business of RNAi Therapeutics in 2012. *Mol Ther Nucleic Acids.* 7 févr 2012;1:e8.
829. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, Doss CGP, Lee S-S. Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine. *Mol Ther Nucleic Acids.* 12 juin 2017;8:132-43.
830. Gebert LFR, Rebhan MAE, Crivelli SEM, Denzler R, Stoffel M, Hall J. Miravirsen (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122. *Nucleic Acids Res.* janv 2014;42(1):609-21.
831. Janssen HLA, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med.* 2 mai 2013;368(18):1685-94.
832. Okada N, Lin C-P, Ribeiro MC, Biton A, Lai G, He X, et al. A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression. *Genes Dev.* 1 mars 2014;28(5):438-50.
833. Xie K, Liu J, Chen J, Dong J, Ma H, Liu Y, et al. Methylation-associated silencing of microRNA-34b in hepatocellular carcinoma cancer. *Gene.* 10 juin 2014;543(1):101-7.
834. Grueter CE, van Rooij E, Johnson BA, DeLeon SM, Sutherland LB, Qi X, et al. A cardiac microRNA governs systemic energy homeostasis by regulation of MED13. *Cell.* 27 avr 2012;149(3):671-83.
835. Aartsma-Rus A, van Vliet L, Hirschi M, Janson AAM, Heemskerk H, de Winter CL, et al. Guidelines for antisense oligonucleotide design and insight into splice-modulating mechanisms. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* mars 2009;17(3):548-53.
836. Montgomery RL, Hullinger TG, Semus HM, Dickinson BA, Seto AG, Lynch JM, et al. Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation.* 4 oct 2011;124(14):1537-47.
837. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science.* 27 avr 2007;316(5824):575-9.
838. Rasmussen KD, O'Carroll D. The miR-144/451eGFP allele, a novel tool for resolving the erythroid potential of hematopoietic precursors. *Blood.* 15 sept 2011;118(11):2988-92.
839. Rasmussen KD, Simmini S, Abreu-Goodger C, Bartonicek N, Di Giacomo M, Bilbao-Cortes D, et al. The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis. *J Exp Med.* 5 juill 2010;207(7):1351-8.

840. Patrick DM, Zhang CC, Tao Y, Yao H, Qi X, Schwartz RJ, et al. Defective erythroid differentiation in miR-451 mutant mice mediated by 14-3-3 ζ . *Genes Dev.* 1 août 2010;24(15):1614-9.
841. Chau BN, Xin C, Hartner J, Ren S, Castano AP, Linn G, et al. MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. *Sci Transl Med.* 15 févr 2012;4(121):121ra18.
842. Vedantam G. Clostridium difficile colonization and virulence: A complex interplay between toxin and non-toxin factors. *International C. difficile Symposium; 2018 sept 12; Bled, Slovenia.*
843. Ramos HC, Rumbo M, Sirard J-C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* nov 2004;12(11):509-17.
844. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol.* oct 2014;14(10):667-85.
845. Viladomiu M, Hontecillas R, Pedragosa M, Carbo A, Hoops S, Michalak P, et al. Modeling the Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and MicroRNA-146 in Mucosal Immune Responses to Clostridium difficile. *PLoS ONE.* 7(10).
846. Kurowska-Stolarska M, Alivernini S, Ballantine LE, Asquith DL, Millar NL, Gilchrist DS, et al. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5 juill 2011;108(27):11193-8.
847. Du C, Liu C, Kang J, Zhao G, Ye Z, Huang S, et al. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol.* déc 2009;10(12):1252-9.
848. Zheng C-Z, Shu Y-B, Luo Y-L, Luo J. The role of miR-146a in modulating TRAF6-induced inflammation during lupus nephritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(5):1041-8.
849. Pfeiffer D, Roßmanith E, Lang I, Falkenhagen D. miR-146a, miR-146b, and miR-155 increase expression of IL-6 and IL-8 and support HSP10 in an In vitro sepsis model. *PloS One.* 2017;12(6):e0179850.
850. Pfeiffer SR, Yang CH, Pfeiffer LM. The Role of miR-21 in Cancer. *Drug Dev Res.* sept 2015;76(6):270-7.
851. Feng J, Li A, Deng J, Yang Y, Dang L, Ye Y, et al. miR-21 attenuates lipopolysaccharide-induced lipid accumulation and inflammatory response: potential role in cerebrovascular disease. *Lipids Health Dis.* 7 févr 2014;13:27.
852. Ding S, Huang H, Xu Y, Zhu H, Zhong C. MiR-222 in Cardiovascular Diseases: Physiology and Pathology. *BioMed Res Int.* 2017;2017:4962426.
853. Mizuno K, Mataka H, Arai T, Okato A, Kamikawaji K, Kumamoto T, et al. The microRNA expression signature of small cell lung cancer: tumor suppressors of miR-27a-5p and miR-34b-3p and their targeted oncogenes. *J Hum Genet.* juill 2017;62(7):671-8.
854. Barros-Silva D, Costa-Pinheiro P, Duarte H, Sousa EJ, Evangelista AF, Graça I, et al. MicroRNA-27a-5p regulation by promoter methylation and MYC signaling in prostate carcinogenesis. *Cell Death Dis.* 7 févr 2018;9(2):167.

855. Mertens-Talcott SU, Chintharlapalli S, Li X, Safe S. The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res.* 15 nov 2007;67(22):11001-11.
856. Romay MC, Che N, Becker SN, Pouldar D, Hagopian R, Xiao X, et al. Regulation of NF- κ B signaling by oxidized glycerophospholipid and IL-1 β induced miRs-21-3p and -27a-5p in human aortic endothelial cells. *J Lipid Res.* janv 2015;56(1):38-50.
857. Chen H, Zhang Z, Zhang L, Wang J, Zhang M, Zhu B. miR-27a protects human mitral valve interstitial cell from TNF- α -induced inflammatory injury via up-regulation of NELL-1. *Braz J Med Biol Res.* 51(6).
858. Li X-Q, Lv H-W, Wang Z-L, Tan W-F, Fang B, Ma H. MiR-27a ameliorates inflammatory damage to the blood-spinal cord barrier after spinal cord ischemia: reperfusion injury in rats by downregulating TICAM-2 of the TLR4 signaling pathway. *J Neuroinflammation.* 7 févr 2015;12:25.
859. Xie N, Cui H, Banerjee S, Tan Z, Salomao R, Fu M, et al. miR-27a regulates inflammatory response of macrophages by targeting IL-10. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 juill 2014;193(1):327-34.
860. Tili E, Michaille J-J, Piurowski V, Rigot B, Croce CM. MicroRNAs in intestinal barrier function, inflammatory bowel disease and related cancers-their effects and therapeutic potentials. *Curr Opin Pharmacol.* 2017;37:142-50.
861. Yang Q, Zhang D, Li Y, Li Y, Li Y. Paclitaxel alleviated liver injury of septic mice by alleviating inflammatory response via microRNA-27a/TAB3/NF- κ B signaling pathway. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* janv 2018;97:1424-33.

CONFIDENTIEL

Titre : Inflammation associée aux infections à *Clostridium difficile* : rôle des flagelles et régulation par les microARN

Mots clés : *C. difficile*, ICD, FliC, TLR5, inflammation, miARN, NF-κB, miR-27a-5p-mimic

Résumé : *Clostridium difficile* (CD) représente la première cause d'infections digestives nosocomiales dans les pays développés. Les infections à CD (ICD) induisent une inflammation intestinale importante laquelle se manifeste principalement par des colites pseudomembraneuses et d'autres complications ainsi que par un taux de mortalité élevé. Les toxines TcdA et TcdB représentent les facteurs majeurs de virulence, mais d'autres composants bactériens sont également impliqués dans le processus pathologique, et en particulier les flagelles. Il a été montré que la flagelline de CD interagit avec le récepteur TLR5 exprimé à la surface des cellules épithéliales intestinales et active principalement la voie de signalisation pro-inflammatoire de NF-κB. Dans la première partie des travaux de cette thèse, nous avons validé ce rôle des flagelles *in vivo* dans un modèle murin d'ICD, en montrant que les

flagelles induisent une réponse inflammatoire au niveau de la muqueuse caecale en synergie avec les toxines. La régulation de cette inflammation par les microARN (miARN) a été ensuite étudiée. Nous avons montré que CD induit l'expression *in vitro* et *in vivo* du miR-27a-5p. Les résultats de nos travaux suggèrent que ce miARN est induit par l'activation de la voie de NF-κB dans des cellules épithéliales intestinales Caco-2 stimulées par FliC et exerce une activité anti-inflammatoire en modulant l'activation de cette même voie de signalisation en boucle de retrocontrôle négatif. Le traitement d'un modèle murin d'ICD par un miR-27a-5p-mimic réduit l'inflammation intestinale des souris infectées apportant la preuve du concept pour une nouvelle approche thérapeutique. Cette approche pourrait être considérée dans le traitement de l'inflammation associée aux ICD.

Title: Inflammation associated with *Clostridium difficile* infections: role of flagella and regulation by microRNA

Keywords: *C. difficile*, ICD, FliC, TLR5, inflammation, miRNA, NF-κB, miR-27a-5p-mimic

Abstract: *Clostridium difficile* (CD) is the leading cause of nosocomial intestinal infections in developed countries. CD infections (CDI) induce significant intestinal inflammation which is manifested primarily by pseudomembranous colitis and other complications as well as a high mortality rate. The toxins TcdA and TcdB represent the major factors of virulence of CD, but other bacterial components, particularly flagella, are also involved in the pathological process. It has been shown that the CD flagellin interacts with the TLR5 receptor expressed on the surface of intestinal epithelial cells and predominantly activates the pro-inflammatory NF-κB signaling pathway. In the first part of this work, we validated this role of the flagella *in vivo* in a mouse model of CDI, by showing that flagella induce a pro-inflammatory response

in intestinal epithelium in synergy with toxins. The regulation of this inflammation by microRNAs (miRNAs) was then studied. We have shown that CD induces expression of the miR-27a-5p *in vitro* and *in vivo*. Our results show that this miRNA is induced by the activation of the NF-κB pathway in FliC-stimulated Caco-2 intestinal epithelial cells and exerts an anti-inflammatory activity by modulating the activation of this same signaling pathway in a negative feedback manner. The treatment of a mouse model of CDI with miR-27a-5p-mimic reduces the intestinal inflammation of infected mice, providing proof of concept for a new therapeutic approach. This approach could be considered in the treatment of inflammation associated with CDI.

