



HAL
open science

La survie et la multiplication des E.coli Adhérentes Invasives (AIEC) dans les macrophages impliquent la formation d'une communauté intracellulaire structurée par une matrice d'exopolysaccharides, abritant des persitants

Victoria Prudent

► **To cite this version:**

Victoria Prudent. La survie et la multiplication des E.coli Adhérentes Invasives (AIEC) dans les macrophages impliquent la formation d'une communauté intracellulaire structurée par une matrice d'exopolysaccharides, abritant des persitants. Médecine humaine et pathologie. Université Paris sciences et lettres, 2019. Français. NNT : 2019PSLET034 . tel-03339644

HAL Id: tel-03339644

<https://theses.hal.science/tel-03339644v1>

Submitted on 9 Sep 2021

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.



THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée au Collège de France

**La survie et la multiplication des E.coli Adhérentes Invasives
(AIEC) dans les macrophages impliquent la formation d'une
communauté intracellulaire structurée par une matrice
d'exopolysaccharides abritant des persitants**

Soutenue par

Victoria PRUDENT

Le 13 décembre 2019

Ecole doctorale n° 577

**Structure et Dynamique des
Systèmes Vivants**

Spécialité

**Science de la vie et de la
santé**

Composition du jury :

Stéphanie BURY MONET
Professeur, UPSud

Président

Christophe BELOIN
Dr, Institut Pasteur

Rapporteur

Romain BRIANDET
Dr, INRA-AgroParisTech

Rapporteur

Nicolas DESPRAT
Maitre de conférences, ENS-Paris Diderot

Examineur

Alice LEBRETON
Chargé de recherche, ENS-INRA

Examineur

Nicolas BARNICH
Professeur des universités, Université d'Auvergne

Examineur

Olivier ESPELI
Dr, CNRS, Collège de France

Directeur de thèse



**COLLÈGE
DE FRANCE**
— 1530 —

Sommaire

Résumé de la thèse	10
Introduction	
Partie 1 Contexte général du travail de thèse	12
1 - Le microbiote intestinal humain est un écosystème complexe	12
2-La dysbiose : perte de l'équilibre microbiotique	13
3- Adaptation des bactéries aux changements d'environnement	14
4- Objectifs de mon travail de thèse	14
Partie 2 Équilibre de la flore intestinale et pathogénicité	16
1- Maladie de Crohn.....	16
2- Lien entre microbiote et maladie de Crohn	18
2-1 Déficience en NOD2 chez les patients atteints de la maladie de Crohn et perturbation du microbiote	18
2-2 Rôle du microbiote dans la MC et la colonisation par les AIEC	21
3- Adhérente Invasive E. coli (AIEC)	22
Partie 3 Infection des cellules épithéliales de la barrière intestinale par les AIEC	26
1- Mucus	26
1 -1 Traversée du mucus par LF82.....	28
1-2 Formation de biofilm extracellulaire par LF82	28
2- La colonisation des cellules épithéliales	28
2 -1 Facteurs d'adhésion aux cellules épithéliales de LF82.....	30
2-1-1 Pili	30
2-1-2 Flagelle.....	32
2-1-3 OMV	34
2 -2 Perturbation de la monocouche épithéliale.....	36
2 -3 Réplication dans les cellules épithéliales intestinales	36
Partie 4 Infection des Macrophages par LF82	38
1- Caractéristiques générales	38
2- Cas particulier des macrophages du tractus intestinal	39
3- Phagocytose	40
4- Autophagie	44
5- Mort programmée	46
6- Polarisation	46
7- Systèmes de séquestration du fer : hypoferremia	46
8- Subversion des macrophages par les bactéries pathogènes	50
8-1 Le paradoxe des macrophages : première ligne de défense et niche privilégiée	52
8-2 Mécanismes de détournement des macrophages par les bactéries pathogènes	53
8-2-1 Sécrétion d'effecteurs	54
8-2-1-1 Les appareils de sécrétion de type 3.....	54
8-2-1-2 Les appareils de sécrétion de type 4.....	56
8-2-1-3 Les appareils de sécrétion de type 6.....	56
8-2-2 Détournement de la voie phagolysosomale	59

8-2-2-1 <i>Listeria monocytogenes</i>	59
8-2-2-2 <i>Salmonella enterica</i>	60
8-2-2-3 <i>Chlamydia pneumoniae</i>	62
8-2-2-4 <i>Legionella pneumophila</i> / <i>Brucella abortus</i>	62
8-2-2-5 <i>Coxiella burnetii</i>	64
8-3 Infection des macrophages par LF82	64
8-3-1 Blocage de l'apoptose	65
8-3-2 TNF- α et l'homéostasie du fer	67
8-3-3 HtrA	68
8-3-4 Protéine Dsb	70
8-4 Infection des neutrophiles par LF82	72
9- Comparaison des génomes et hypothèses de travail	72
Partie 5 Formation de biofilm comme stratégie invasive	76
1- Les généralités sur les biofilms	76
1-1 Définition des biofilms.....	76
1-2 Matrice extracellulaire	78
1-2-1 Composition de la matrice extracellulaire	80
1-2-1-1 β -1,6- N -acétyl-D-glucosamine (PGA).....	80
1-2-1-2 Les curlis	80
1-2-1-3 La cellulose	82
1-2-1-4 Acide colanique	82
1-3 Hétérogénéité chimique et physiologique des biofilms in vitro	84
2- La cascade de régulation de la matrice extracellulaire	86
3- Cycle de vie du biofilm.....	90
3-1 Attachement.....	90
3-2 Prolifération et maturation	91
3-3 Dispersion	91
4- Quorum sensing	92
5- Adaptabilité des biofilms face à un stress	92
6- Les Biofilms lors de l'infection	96
6-1 Biofilm de <i>P. aeruginosa</i> et infection.....	96
6-1-1 Formation du biofilm de <i>P.aeruginosa</i>	97
6-1-2 Captation du fer pour la formation de biofilm par <i>P. aeruginosa</i>	97
6-1-3 Echappement de <i>P. aeruginosa</i> aux défenses immunitaires	98
6-2 Biofilm des UPEC et infections intracellulaires	98
6-2-1 Biofilm intracellulaire formé par les UPEC.....	100
6-2-2 Adhésion des UPEC aux cellules épithéliales	100
6-2-3 Multiplication intracellulaire des UPEC	102
6-2-4 Echappement des UPEC	102
6-2-5 Implication du fer dans la formation des biofilms d'UPEC	104
6-2-6 Le dimorphisme des UPEC leur permet d'échapper à la phagocytose par les neutrophiles	106
6-3 Les biofilms formés par les AIEC.....	107
6-3-1 La colonisation de l'intestin par la bactérie LF82 nécessite la formation de biofilm	107

6-3-1-1 La protéine bcmA (biofilm coupled to motility A)	107
6-3-1-2 L'opéron waaWVL	109
6-3-2 Rôle du fer dans la formation de biofilm des AIEC.....	109
Partie 6 Formation de persistants pour la survie intracellulaire	111
1- Définition des bactéries en persistance	111
2- Génétique des persistants.....	113
2 -1 Réponse aux stress	113
2 -2 Réponse à une carence en nutriment médiée par le ppGpp	115
2 -3 Réponse SOS	116
3- Quorum sensing.....	116
4- Système toxine antitoxine	117
4 -1 Action par le ppGpp, exemple de HipAB	117
4 -2 Réponse SOS, exemple de TisAB	119
4 -3 Implication d'un phage dans le phénotype de persistance associé aux TA	119
5- Résistance phénotypique	121
6- Persistance et infection	121
7- Biofilm et persistance	125
Matériels et Méthodes	126
Résultats	142
Partie 7 Article 1	142
Partie 8 Article 2	168
Partie 9 Microscopie électronique des macrophages infectés par LF82.....	224
Partie 10 Caractérisation d'un système de sécrétion de type VI putatif	229
1- Implication du T6SS putatif dans la survie dans les macrophages	231
2- Etude du phénotype d'infection des mutants de délétion du T6SS en macrophages murins RAW 264.7	232
3- Suivi de l'expression de T6SS putatif au cours de l'infection	233
4- Compétition in vitro entre les souches E. coli C600 GFP et LF82 RPSM mCherry.....	236
Discussion.....	238
Bibliographie.....	256

Liste des figures

Figure 1 - Origines de la composition du microbiome du tractus intestinal	11
Figure 2 - Altération de l'équilibre chez les patients atteints de la maladie de Crohn	17
Figure 3 - Voie de signalisation NF-KB via NLR et NOD	20
Figure 4 - Régulation de la voie Nfkb via NOD2	20
Figure 5 - Profil d'adhérence des E.coli pathogènes à l'épithélium de l'hôte	23
Figure 6 - Défenses de la barrière intestinale	27
Figure 7 - Microscopie électronique à transmission des cellules intestinales-407 infectées par la souche LF82	29
Figure 8 - Adhésion de la bactérie LF82 aux cellules épithéliales intestinales	31
Figure 9 - Coupe fine de P. aeruginosa PAO1 montrant le développement des OMV avant qu'ils ne soient libérés de la cellule	33
Figure 10 - Organisation de la membrane des bactéries Gram négatives	33
Figure 11 - Les bactéries AIEC LF82 interagissent avec l'autophagie dans des lignées de cellules épithéliales	35
Figure 12 - Maturation du phagosome	41
Figure 13 - Mécanismes de dégradation des bactéries dans les phagolysomes.....	43
Figure 14 - Présentation d'Ag via le CMH-II- activation de l'immunité spécifique	43
Figure 15 - Amorçage de l'Ag bactérien sur le CMH-II et présentation à la surface via le réseau de microtubules	45
Figure 16 - Polarisation des macrophages	45
Figure 17 - Régulation du fer par Fur	47
Figure 18 - Absorption du fer par les sidérophores chez les bactéries Gram négative	49
Figure 19 - Structure des sidérophores	51
Figure 20 : Systèmes de sécrétion	57
Figure 21 - Infection des macrophages par les bactéries pathogènes intracellulaires	61
Figure 22 - Infection des macrophages par les bactéries pathogènes intracellulaires	63
Figure 23 - Infection des macrophages par LF82	66
Figure 24 - Organisation du génome de quatre îlots pathogènes (PAI) de LF82 porteurs de gènes liés à la virulence.....	69
Figure 25 - Création de liaisons disulfures pour stabiliser les protéines.....	71
Figure 26 - Phylogénie à probabilité maximale générée à partir de 16 062 SNP	73
Figure 27 - Impact de l'environnement sur le développement des biofilms de P.aeruginosa	77
Figure 28 - Biosynthèse du pga	79
Figure 29 - Biosynthèse des curli.....	79
Figure 30 - Système phosphorelay rcsCDB.....	81
Figure 31 - Hétérogénéité chimique et physiologique des biofilms	83
Figure 32 - Régulation de la production de cellulose et de curli	85
Figure 33 - Régulation des ARNm rpoS, ydaM et csgD via la partie 5'-UTR	87
Figure 34 - Cycle de vie d'un biofilm bactérien	89
Figure 35 - Mécanisme de tolérance aux antibiotiques des biofilms.....	93
Figure 36 - Microscopie électronique à balayage d'un biofilm de P. aeruginosa à la surface d'un galet de granit	95
Figure 37 - Cycle de lyse nécrotique des neutrophiles dans les infections par biofilms de P.aeruginosa	99
Figure 38 - Formation de biofilm intracellulaire dans les cellules de la vessie	101
Figure 39 - Cycle infectieux des UPEC dans les cellules épithéliales de la vessie	103
Figure 40 - Échappement des UPEC des cellules épithéliales	105
Figure 41 - La filamentation des UPEC au cours du processus infectieux les protège contre les attaques des neutrophiles.....	105

Figure 42 - Implication de l'opéron waaWVL dans l'interaction de la souche AIEC avec la muqueuse intestinale	108
Figure 43 - Cinétique de destruction biphasique d��e à un traitement antibiotique bactéricide	112
Figure 44 - Régulation de RpoS chez E.coli sous contrôle des facteurs environnementaux	114
Figure 45 - Autorégulation transcriptionnelle des modules TA de type II grâce à la coopérativité conditionnelle	118
Figure 46 - Les quatre principaux types de modules TA	118
Figure 47 - Régulation des modules TA par la réponse aux stress contribuant à la persistance bactérienne ...	120
Figure 48 - Cinétique de survie a la céfotaxime de Salmonella spp.....	122
Figure 49 - Plasmide de dilution de fluorescence	124
Figure 50 - Biofilm de la souche LF82 in vitro	224
Figure 51 – Microscopie électronique des macrophages RAW 24h post infection par la bactérie LF82	225
Figure 52 Schéma du protocole de cryomicroscopie pour visualiser la matrice extracellulaire produite par LF82 durant l'infection des macrophages RAW.	226
Figure 53 - Cryomicroscopie SEM 24h post infection des macrophages RAW par LF82 WT	227
Figure 54 - Cryomicroscopie SEM 24h post infection des macrophages RAW par LF82 Δ csgD.....	228
Figure 55 - Marquage de la lectine WGA 24h post infection des macrophages RAW par LF82 et C600	228
Figure 56 - Résultats du Tn seq et du RNA seq superposés au cluster de gènes du T6SS.....	229
Figure 57 - Protéines de l'appareil de sécrétion de Type VI	230
Figure 58 - Représentation graphique du ratio des CFU 24h/1h après infection dans les macrophages murins RAW 264.7.....	231
Figure 59 - Microscopie et représentation graphique de la formation de foyer des mutants du T6SS en comparaison avec la souche sauvage 24h post infection (PI) en macrophages murins RAW 264.7	232
Figure 60 - Acquisition d'images par microscopie des cultures de LF82_769-GFP poussant à 30��C ou 37��C sous agitation 180 RPM.....	234
Figure 61 - Représentation graphique du ratio des CFU 24h/1h PI de la souche LF82_769-GFP en macrophages murins RAW 264.7	235
Figure 62 - Acquisition d'image de macrophages murins RAW 264.7 infectés par LF82_769-GFP HU mCherry MOI 50 fixés 1h et 24h post infection.	236
Figure 63: Time laps de la compétition entre LF82 RPSM mCherry et C600 GFP	237
Figure 64- Modèle de l'adapation de la bactérie LF82 dans les macrophages	240
Figure 65- Expression du rapporteur de stress acide p1485 GFP (vert) par la bac��trie LF82 (rouge) 24h post infection dans les phagolysosomes (bleu) des macrophages (violet).	243
Figure 66- Croissance de biofilms dans un environnement à résistance mécanique.	246
Figure 67- Accumulation d'E. coli et V. harveyi et détection du quorum.	247
Figure 68- Modèle d'acquisition du Fer chez P.aeruginosa par sécrétion du facteur TseF via le complexe OMV	252
Tableau 1 - Tableaux des principaux PRR et nature des ligands.....	41
Tableau 2 - Macrophage comme niche privilégiée de certaines bactéries intracellulaires.....	55

Liste des symboles et des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
AIEC	<i>Escherichia coli</i> adhérent-invasifs
APEC	<i>Escherichia coli</i> pathogènes aviaires
ATG	Autophagy related genes
BcmA	Biofilm coupled to motility A
CEACAM6	Molécule d'adhésion cellulaire liée à l'antigène carcino-embryonnaire
c-di-GMP	Bis-(3',5')-cyclic-dimeric-guanosine monophosphate
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité II
CCL8	Chemokine C-C motif ligand 8
CARD15	<i>Caspase recruitment domain containing protein 15</i>
DSB	Disulphide bond
DAEC	<i>E. coli</i> à adhésion diffuse
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPEC	<i>E. coli</i> entéropathogènes
EIEC	<i>E. coli</i> entéroinvasifs
EAEC	<i>E. coli</i> entéroagréatifs
ETEC	<i>E. coli</i> entérotoxinogènes
EHEC	<i>E. coli</i> entérohémorragiques

EPS	Polymères extracellulaires
ExPEC	<i>E.coli</i> pathogènes extra- intestinaux
Fe	Fer
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
GltX	Glutamyl-ARNt synthétase
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HIP	High pathogenicity Island
IgA	Immunoglobulines A
IL	Interleukine
IFN	Interferon
IRGM	Immunity Related GTPase M
IAHP	IcmF Associated Homologous Proteins
IBC	Intracellular bacterial communities
LLO	Listeriolysine O
LRR	Répétitions riche en leucine
Lamp	Protéines membranaires associées aux lysosomes
LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
Lpp	Lipoprotéine de Braun
LPS	Lipopolysaccharide
MICI	Maladies inflammatoires de l'intestin
MC	Maladie de Crohn
MDP	Muramyl dipeptide
Mn	Manganèse

Mg	Magnesium
NOD2	Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing Protein 2
NO	Oxyde nitrique
Nf-kB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OMV	vésicules de membranes externes
O₂	oxygène
ppGpp	Alarmonne guanosine 3',5'-bispyrophosphate
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PAMPs	pathogen associated molecular pattern
PGA	Poly- β -1,6-GlcNAc ou β -1,6- <i>N</i> -acétyl-D-glucosamine
QS	quorum sensing
RIPk2	Séronine-thréonine kinase-2
RpoS	Acide ribonucleique polymerase sigma S
RNAseq	Acide ribonucleique sequencing
STEC	<i>E. coli</i> produisant une toxine Shiga
STED	Stimulated emission depletion <i>microscopy</i>
TNF-α	facteur de nécrose tumorale alpha
TLR	Toll like receptor
TA	Système toxine/antitoxine
TXSS	Système de sécrétion de type X
Tnseq	Transposon sequencing
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropathogènes

V-ATPase	Vacuolar-type ATPase
WGA	Wheat germ agglutinin
ZO-1	Zonula occludens-1
Zn	Zinc
σ^E	Facteur sigma alternatif E
ON	Over night

Résumé de la thèse: La survie et la multiplication des *E.coli* Adhérentes Invasives (AIEC) dans les macrophages impliquent la formation d'une communauté intracellulaire structurée par une matrice d'exopolysaccharides, abritant des persistants.

Les patients atteints de la maladie de Crohn présentent une colonisation anormale de l'intestin par des protéobactéries, parmi lesquelles la famille des *E. coli* envahissants adhérents (AIEC) a été caractérisée. Les AIEC se trouvent dans les lésions intestinales chez les patients atteints de maladie inflammatoire de l'intestin tel que la maladie de Crohn. Les AIEC prédominent dans le mucus, adhèrent aux cellules épithéliales, les colonisent et survivent dans les macrophages. Durant ma thèse, je me suis intéressée particulièrement à la caractérisation de l'adaptation de l'AIEC à la survie et à la croissance dans les macrophages. La souche AIEC LF82 réside dans des phagolysosomes mûres qui créent un environnement stressant (pH acide, stress oxydatif, manque de nutriments, etc.). Cet environnement limite considérablement la croissance d'autres souches d'*E. coli*. Nous avons démontré que la réponse stringente et l'induction de la réponse SOS sont essentielles à la survie et à la multiplication de LF82 au sein des macrophages. Aux premiers stades de l'infection par les macrophages, LF82 produit une matrice extra-bactérienne composée de sucres et de fibres curli. La microscopie STED à super résolution montre que chaque bactérie est entourée par cette matrice. J'ai démontré que la modification des voies impliquées dans la formation de biofilms avait un impact important sur la construction de la matrice mûre et sur la survie de la souche LF82 au sein des macrophages. Ceci suggère qu'une structure semblable à un biofilm est formée par LF82 à l'intérieur des phagolysosomes. Nous avons également démontré que cette matrice augmentait le nombre d'LF82 tolérants aux antibiotiques présents dans les macrophages en augmentant la sous population de persistants. Enfin, nous avons identifié certains gènes AIEC, absents du génome d'*E. coli* commensal, nécessaires à la formation de la matrice telle que la yersiniabactine exprimé dans l'îlot de pathogénicité II et un nouveau T6SS putatif.

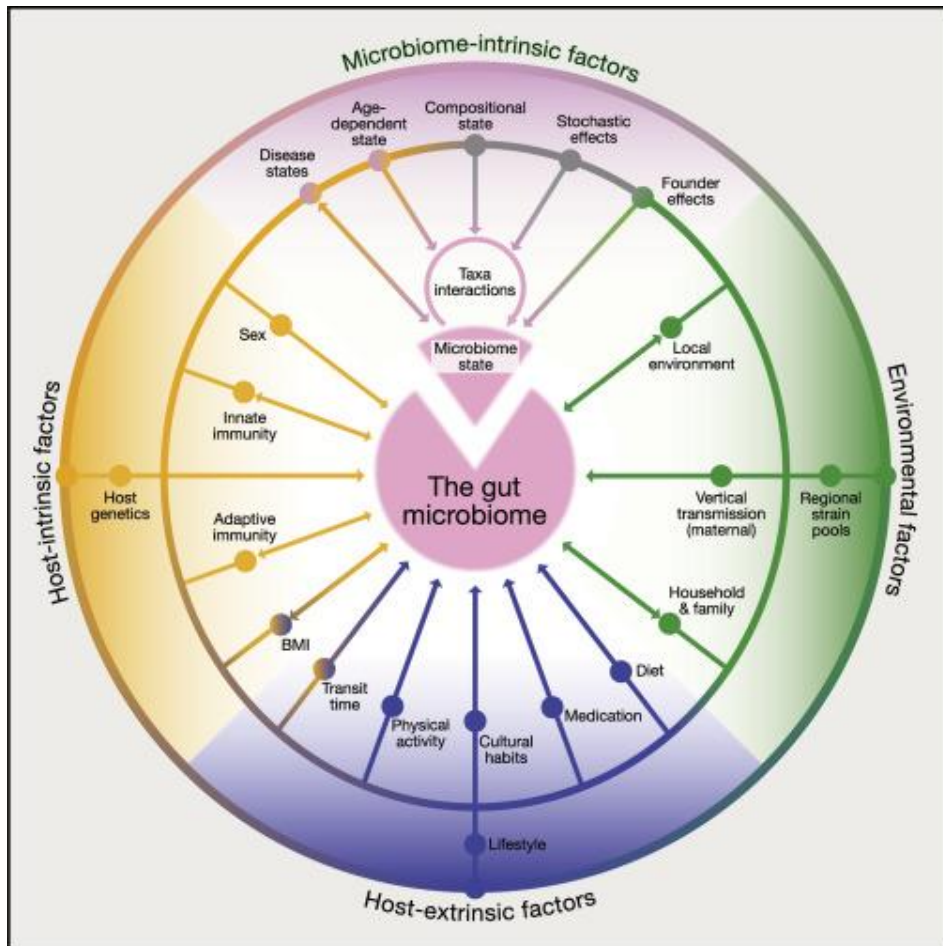


Figure 1 - Origines de la composition du microbiome du tractus intestinal

Introduction

Partie 1 – Contexte général du travail de thèse

1- Le microbiote intestinal humain est un écosystème complexe

Le terme microbiote est utilisé pour désigner l'ensemble des micro-organismes (bactéries, archae, levures, champignons, virus, bactériophages) présents au sein d'un écosystème. Le microbiote intestinal humain est composé de 10^{14} bactéries et d'autres micro-organismes entretenant une relation symbiotique avec leur hôte (Qin et al. 2010). Ce microbiote inclut des micro-organismes endogènes, résidents permanents de l'intestin, et des micro-organismes de passage provenant essentiellement de l'alimentation, mais aussi de la bouche, du nez, du rhinopharynx, et des voies aériennes (expectorations, déglutitions). Il est acquis dès la naissance et se stabilise vers les 2-3 ans (Rajilić-Stojanović et al. 2012). Les membres de la communauté bactérienne resteront globalement inchangés tout au long de la vie d'un hôte, mais cette communauté peut être néanmoins influencée et fluctuer par l'intervention de facteurs environnementaux ; l'âge, l'alimentation, le mode de vie, l'hygiène, la prise d'antibiotiques et l'état de santé (**Figure 1**). Il semble par ailleurs exister une association entre la génétique de l'hôte et la composition du microbiote intestinal. Plusieurs séries d'études réalisées sur des jumeaux par séquençage des ARNr 16S des bactéries composant le microbiote (Goodrich et al. 2016) font apparaître que les jumeaux monozygotes ont une forte similarité de la composition bactérienne en comparaison à celle des jumeaux hétérozygotes. Ceci suggère une hérédité partielle du microbiote. Les micro-organismes endogènes, pour la plupart, n'expriment pas de caractère pathogène (soit parce qu'ils n'en ont aucun, soit parce que ce dernier est réprimé) mais au contraire présentent beaucoup de fonctions bénéfiques (symbiotiques).

Le microbiote peut être considéré comme un organe à part entière du corps humain. Une de ses principales fonctions est d'être une barrière par effet de compétition de niche, empêchant l'invasion par les pathogènes. Il joue également un rôle physiologique dans l'assimilation des aliments et dans la maturation et l'éducation du système immunitaire innée, permettant d'éviter des réponses immunitaires inappropriées et le déclenchement d'infections chroniques.

L'équilibre du microbiote intestinal relève cependant de l'art du funambule, avec d'un côté du balancier, les micro-organismes commensaux et de l'autre, les micro-organismes pathogènes. Le maintien de l'équilibre est un mélange subtil entre une réponse immunitaire tolérante et une réponse immunitaire défensive rapide et efficace pour prévenir des dommages potentiels de l'intestin (Nagao-Kitamoto et al. 2016).

L'avancée technologique des dernières années a permis d'augmenter de façon exponentielle notre compréhension du microbiote, ses rôles apparaissent multiples et à ce jour de nombreuses études établissent des liens entre la composition du microbiote et différentes pathologies telles que le cancer, l'obésité, la dépression, l'inflammation chronique ou l'autisme (Schmidt, Raes, et Bork 2018).

2- La dysbiose : perte de l'équilibre microbiotique

Une dysbiose est une perturbation prolongée du microbiote. Il existe trois types d'anomalies compositionnelles au cours d'une dysbiose : un excès de pathobiontes (micro-organismes potentiellement pathogènes), un manque d'un ou quelques micro-organismes bénéfiques, et une perte globale de la structure de l'écosystème (Buret et al. 2019; Sebastián Domingo et Sánchez Sánchez 2018). La seule présence d'un pathogène n'est pas suffisante à définir une dysbiose, il existe par exemple des porteurs sains de *Clostridium difficile* toxino-sécréteurs ou de Salmonelles (Donskey, Kundrapu, et Deshpande 2015).

Certaines déviations de composition du microbiote associées à des maladies ou situations sont tellement caractéristiques qu'on peut employer le terme de signatures. La maladie de Crohn fait partie de ces maladies où le rôle du microbiote apparaît clairement (L. C.-H. Yu 2018). C'est une maladie inflammatoire pouvant atteindre n'importe quel segment du tube digestif depuis la bouche jusqu'à l'anus. Elle a été décrite pour la première fois en 1932 par un médecin américain : Burril B Crohn. L'équilibre microbiotique est rompu lors de la maladie de Crohn en raison des facteurs de risques génétiques, immunologiques et environnementaux (Buttó, Schaubeck, et Haller 2015). La réponse immunitaire des patients est altérée ce qui perturbe la flore intestinale favorable et favorise l'implantation de bactéries moins favorables (Baumgart et Sandborn 2012; Buret et al. 2019). Certaines bactéries dont on observe la diminution ont des propriétés anti-inflammatoires et on suppose que leur absence ait des conséquences physiologiques (Reinoso Webb et al. 2016).

A l'inverse, certains pathogènes ou pathobiontes pro- inflammatoires tels que les *Escherichia coli* adhérent-invasifs (AIEC), *Mycobacterium avium paratuberculosis* ou des bactéries productrices de sulfures sont au contraire observées en plus grand nombre lors de la maladie (Mann et Saeed 2012).

3- Adaptation des bactéries aux changements d'environnement

Les bactéries du microbiote intestinal doivent s'adapter à de nombreux et rapides changements d'environnements. Ces changements sont imposés par l'alimentation, la compétition avec d'autres micro-organismes, les défenses immunitaires et les changements de niche. Les AIEC qui colonisent l'intestin des patients de la maladie de Crohn sont un bon exemple de cette impérieuse nécessité d'adaptation car elles colonisent au moins trois différents écosystèmes ; la lumière intestinale, les cellules épithéliales et les macrophages (Shaler, Elhenawy, et Coombes 2019). Elles évoluent dans un hôte où l'inflammation est chronique et où les changements de microbiotes sont importants (Alhagamhmad et al. 2016a). Les traitements des patients par des anti-inflammatoires ou des antibiotiques vont également modifier leur environnement. De nombreuses stratégies adaptatives sont bien décrites chez différentes bactéries modèles. Ces stratégies vont de la simple induction de l'expression de quelques protéines à la formation d'écosystèmes structurés multi espèces comme des biofilms.

4- Objectifs de mon travail de thèse

Le sujet de ma thèse est l'étude de l'adaptation et la croissance de la bactérie LF82 de la famille des AIEC dans un environnement stressant tel qu'elle le rencontre dans l'appareil digestif lors de l'infection et particulièrement dans les macrophages. En effet, LF82 ne détoxifie pas les phagolysosomes dans lesquels elle se retrouve piégée lors de l'infection des macrophages. Elle arrive malgré tout à se multiplier et former des foyers, ce processus d'infection est original parmi les bactéries pathogènes.

Pour comprendre les enjeux de mon travail de thèse, je présenterai tout d'abord la maladie de Crohn et certains des facteurs, plus particulièrement microbiotiques, pouvant influencer son développement. Dans un deuxième temps, j'exposerai les moyens utilisés par l'hôte

pour se défendre contre les pathogènes et les systèmes de défense mis en évidence à ce jour chez LF82.

Mon travail de thèse a permis de démontrer que LF82 ne peut survivre dans les macrophages qui la phagocytent qu'au prix d'une adaptation drastique. Cette adaptation passant par une forte réponse aux stress présents dans les vacuoles du macrophage implique l'apparition de sous populations de bactéries avec des phénotypes différents à l'intérieur d'une colonie intracellulaire, tel que les persistants. Un autre des aspects suprenant de la survie dans les macrophages mis en évidence dans mon travail de thèse est la formation d'une matrice similaire à un biofilm qui enveloppe les bactéries composant la colonie intracellulaire.

Pour appréhender l'originalité de cette ligne de défense, je décrirai l'état des connaissances sur les biofilms abiotiques, sur les biofilms formés au contact d'un tissu animal et les rares connaissances dont nous disposons sur les biofilms intracellulaires. Dans un dernier temps, j'exposerai dans cette introduction l'état des connaissances sur les bactéries non répliquatives tolérant les stress et les antibiotiques.

Partie 2 – Équilibre de la flore intestinale et pathogénicité

1- Maladie de Crohn

La maladie de Crohn (MC) résulte d'une réponse inflammatoire chronique localisée au niveau de l'intestin chez l'homme. Les lésions se développent à partir d'une accumulation de lymphocytes et de plasmocytes, suivies d'un afflux de macrophages, qui par agrégation génèrent des granulomes. L'inflammation est entretenue par une sécrétion accrue de cytokines par les lymphocytes T, les neutrophiles, les macrophages et les cellules épithéliales notamment le TNF- α , mais aussi IL-12 / IL-23 et d'IFN- γ / IL-17 (Sasaki et al. 2007; Strober, Fuss, et Mannon 2007). L'apparition de la MC est favorisée par la présence de bactéries entériques commensales provoquant une réponse immunitaire aberrante chez des patients ayant des facteurs de prédisposition génétiques. Ces prédispositions génétiques ont été confirmées chez des jumeaux monozygotes montrant une forte transmission familiale de cette maladie (Tysk et al. 1988). L'inflammation peut affecter n'importe quel site du tractus gastro-intestinal, néanmoins l'atteinte de l'iléon terminal est la plus fréquente et les premières lésions muqueuses apparaissent souvent sur les plaques de Peyer. Les plaques de Peyer sont des plateformes sentinelles donnant un accès rapide à la lumière de l'intestin aux cellules immunitaires. La couche réduite de mucus qui les recouvre, favorise les interactions avec de potentiels pathogènes et permet de produire une réponse immunitaire rapide et adaptée.

L'association entre les facteurs de susceptibilités de l'hôte et des facteurs environnementaux et microbiologiques peut déclencher une réponse inflammatoire chronique associée à la MC. La susceptibilité immunitaire causée par une déficience du récepteur de l'immunité innée NOD2 a été associée à un déséquilibre de la flore qui favorise l'implantation dans le tractus digestif de bactéries pathobiontes de la famille des AIEC et notamment LF82 (**Figure 2**).

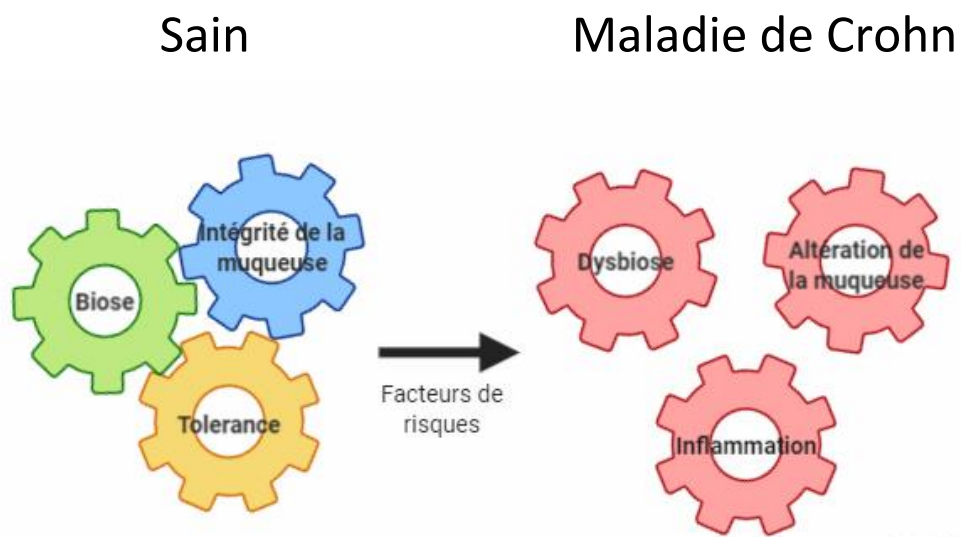


Figure 2 - Altération de l'équilibre chez les patients atteints de la maladie de Crohn

2- Lien entre microbiote et maladie de Crohn

2-1- Déficience en NOD2 chez les patients atteints de la maladie de Crohn et perturbation du microbiote :

Les parents au premier degré des personnes touchées par la MC ont un risque cinq fois supérieur de la déclarer à leur tour, confirmant la susceptibilité familiale de la maladie de Crohn. Des études d'association pangénomique ont permis d'identifier certains gènes spécifiques représentant des facteurs de risques associés à la maladie. Parmi eux, les gènes *NOD2*, *IL23R*, (Rivas et al. 2011) et des gènes d'autophagie, *ATG16L1* et *IRGM*. Fait assez révélateur, la plupart de ces gènes associés à la susceptibilité à la MC sont impliqués dans la reconnaissance et l'élimination des bactéries intracellulaires, soulignant l'importance de l'immunité innée dans la pathogénie des maladies inflammatoires de l'intestin et renforçant l'hypothèse de l'implication de bactéries invasives dans la forme iléale de la MC.

Le plus important facteur de risque pour le développement de la MC est une mutation de la protéine *NOD2* (Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing Protein 2) codée par le gène *CARD15*. Cette protéine appartient à la famille des récepteurs cytoplasmiques mais contrairement aux autres membres Apaf1 et NOD1 de la famille, *NOD2* est préférentiellement exprimée dans les cellules myéloïdes telles que les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages (Ogura et al. 2001; Sidiq et al. 2016, 2). Ces protéines reconnaissant les molécules bactériennes associées aux pathogènes (PAMP pour "pathogen associated molecular pattern") tels les lipopolysaccharides (LPS) et des motifs conservés comme le muramyl dipeptide (MDP), dérivés du peptidoglycane (Kawai et Akira 2009), mais aussi certaines cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α (Rosenstiel et al. 2003; Sidiq et al. 2016). C'est donc un récepteur essentiel dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Les patients possédant un mutant homozygote dans la région *CARD15* codant pour *NOD2* ont un risque 20 à 40 fois plus élevé de développer la maladie (Strober, Fuss, et Mannon 2007). Le microbiote joue un rôle central dans la protection et l'intégrité de la barrière intestinale, l'interaction avec l'hôte *via* les récepteurs de l'immunité innée assure une réponse tolérante essentielle. *NOD2* permet le maintien de cette homéostasie dans la

réponse immunitaire. Il existe ainsi une boucle de rétroaction vertueuse entre NOD2 et les bactéries commensales ; les bactéries commensales favorisent l'expression de NOD2, qui à son tour empêche leur sur-expansion.

En cas de NOD2 déficient, l'incapacité à adapter la réponse immunitaire innée entraîne une inflammation chronique en réponse au microbiote, comme c'est le cas ici avec la maladie de Crohn. En effet, la déficience de l'immunité innée, produisant une inflammation non contrôlée, pourrait nuire à l'intégrité de l'épithélium intestinal et induire une dysbiose. La situation pourrait alors être favorable à l'implantation de pathogènes prenant l'avantage sur les bactéries commensales et amplifier l'inflammation.

Pour assurer sa fonction, NOD2 possède deux domaines de recrutement de caspase (CARD) qui permettent la régulation de l'apoptose et/ou l'activation de la voie Nf-kB contrôlant une réponse pro-inflammatoire et d'autres voies de l'immunité innée (Negroni et al. 2018, 2). Le récepteur NOD2 est activé, lors de la présence d'une bactérie intracellulaire, par le biais de son domaine de répétitions riche en leucine (LRR) qui entraîne l'oligomérisation et le recrutement de la sérine-thréonine kinase-2 (RIPK2) par interaction avec les domaines CARD (**Figure 3**). Le facteur NEMO est ensuite ubiquitiné initiant la voie de signalisation NF-kB. I κ B- α est phosphorylé libérant Nf-kB qui pourra transloquer dans le noyau permettant la transcription des gènes pro-inflammatoires comme ceux des cytokines, les facteurs de croissance et autres facteurs permettant la stimulation des cellules immunitaires (Rahighi et al. 2009).

L'existence paradoxale d'une inflammation accrue dépendant de la voie Nf-kB chez les patients atteints de la maladie de Crohn vient du fait que le récepteur NOD2 a une fonction supplémentaire régulatrice de la réponse inflammatoire: NOD2 inhibe la voie NK-KB en cas de sur-stimulation par les voies de signalisation TLR2 et TLR4 (TLR pour "Toll like receptor") (**Figure 4**). Cette régulation empêche la sécrétion excessive de cytokines pro-inflammatoires qui sont délétères en trop grand nombre (Strober et Watanabe 2011). La dysbiose installée par la déficience du gène NOD2 entraînerait ensuite une activation de la voie Nf-kB indépendante de NOD induisant une surproduction de cytokines pro-inflammatoires sans qu'il y ait de rétrocontrôle négatif. L'activation de NOD2 permet

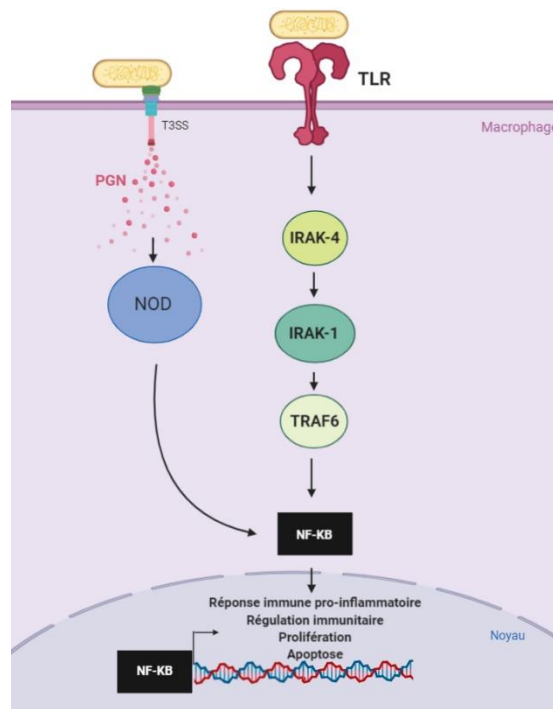


Figure 3 - Voie de signalisation NF-κB via NLR et NOD. Les cellules hôtes reconnaissent les agents pathogènes envahissants par le biais de récepteurs extracellulaires de type Toll (TLR) et intracellulaires de type Nod (NOD). Des agents pathogènes activent les TLR et les molécules adaptatrices qui mènent finalement à l'activation de NF-κB et à une réponse immunitaire pro-inflammatoire. Figure adaptée de (Noto et Peek 2011).

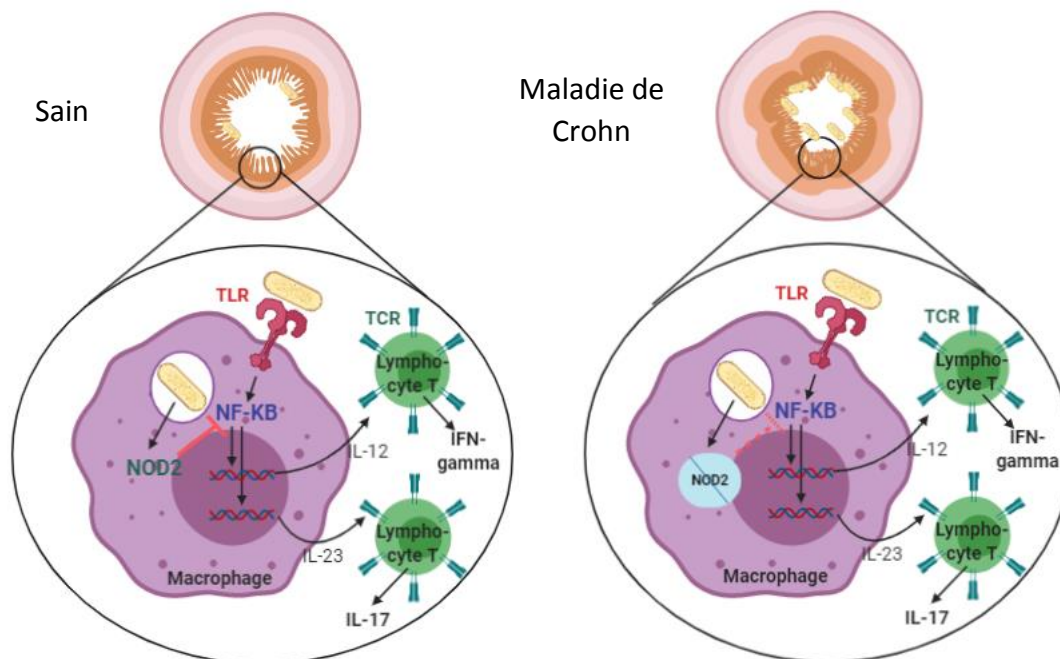


Figure 4 - Régulation de la voie NfκB via NOD2 : La microflore intestinale active NOD2 dans les cellules présentant l'antigène pour induire l'expression d'un ou plusieurs régulateurs négatifs des voies de signalisation du TLR, telles que l'IRF4 et l'IRAK-M. Ce dernier supprime ensuite l'activation de NF-κB par les TLR et inhibe ainsi les réponses pro-inflammatoires des cytokines à la microflore intestinale pendant l'inflammation du côlon. Ainsi, les polymorphismes de NOD2 associés à la maladie de Crohn peuvent contribuer à l'inflammation intestinale en conduisant à une suppression altérée des signaux de TLR induite par NOD2. Cette fonction régulatrice est particulièrement importante dans le tractus gastro-intestinal en raison de l'abondance des ligands potentiels de TLR. Figure adaptée de (Strober et Watanabe 2011).

également de recruter la machinerie autophagique *via* ATG16L1 et une déficience dans cette voie d'élimination est très délétère pour la clairance des bactéries.

NOD2 est également fortement exprimée dans les cellules iléales de Paneth. Les cellules de Paneth résident dans les cryptes où elles induisent la destruction des bactéries en sécrétant des composés antibactériens. Les patients atteints de la MC ayant une déficience pour le gène NOD2 présentent préférentiellement des lésions iléales correspondant à l'emplacement des cellules de Paneth qui ont une production réduite d' α -défensines antimicrobiennes en corrélation avec la mutation de NOD2 (Wehkamp et al. 2005). Ces observations confirment le fin équilibre entre la réponse de l'immunité innée médiée par NOD2 et les bactéries commensales, les deux parties se régulent mutuellement permettant leur protection et leur préservation mutuelle (Petnicki-Ocwieja et al. 2009).

En résumé, la dysbiose bactérienne en association avec d'autres facteurs de susceptibilité de l'hôte est un déclencheur de la maladie de Crohn. Une dysbiose entraîne une inflammation, stimulant le système immunitaire incapable de se réguler dans le cas des patients atteints de la maladie de Crohn déficients pour le gène NOD2 (Sidiq et al. 2016). Le récepteur NOD2 est un des éléments essentiels de l'immunité innée antibactérienne ; il joue un rôle particulier dans la réponse immunitaire aux bactéries intracellulaires en reconnaissant le muramyl dipeptide (MDP) et le LPS et en activant la protéine NF κ B. Certains polymorphismes de NOD2 entraînent une inflammation qui diminue la diversité bactérienne et favorisent l'expansion des *Enterobacteriaceae* et par conséquent l'implantation de bactéries pathogènes (Ellermann et Sartor 2018).

2-2- Rôle du microbiote dans la MC et la colonisation par les AIEC

Le mucus présent à la surface des cellules épithéliales est axénique chez les individus sains. À l'inverse, il a été mis en évidence chez les patients atteints de la MC la présence de nombreuses bactéries. Parmi les bactéries retrouvées dans le mucus, 50% sont des *E. coli* (Martin et al. 2004). De plus, l'analyse de l'intestin de patients atteint de la MC a révélé une colonisation par *E. coli* dans 36.7% des cas en comparaison de 5 à 10% chez des patients sains (Arlette Darfeuille-Michaud 2002; A. Darfeuille-Michaud et al. 1998; Schultsz et al.

1997). Une étude plus récente utilisant une méthodologie différente analysant 95 à 150 colonies d'*E. coli* par patient contre 1 à 15 pour les anciennes études, fait état de 54.5% de la souche *E. coli* appartenant au groupe des Adhérente Invasive *E. coli* (AIEC) dans l'iléon et 50% dans le colon des patients avec la MC (Martinez-Medina, Aldeguer, et al. 2009). L'ADN d'*E. coli* était également plus fréquemment trouvé dans les granulomes de patients atteints de la MC, 80%, alors qu'il n'était plus que 10% chez des patients atteints de maladies intestinales et non intestinales autres que la MC (Ryan et al. 2002). La majorité des souches de *E. coli* retrouvées chez les patients atteints de la maladie de Crohn font partie du groupe des AIEC (Martin et al. 2004), définies comme capable d'adhérer à des cellules épithéliales intestinales différenciées, de polymériser l'actine des cellules épithéliales pour permettre leur entrée, d'envahir les cellules épithéliales, et de survivre et éventuellement de se multiplier dans les macrophages (Arlette Darfeuille-Michaud et al. 2004).

La souche de référence pour les AIEC est la bactérie LF82, initialement isolée à partir de lésions iléales chroniques d'un patient atteint de la maladie de Crohn. LF82 est considéré comme un pathobionte, les sujets en bonne santé peuvent être porteurs de cette souche dans l'intestin sans déclarer de pathologie associée. Même si les AIEC peuvent coloniser l'intestin des individus sains, il n'a pas été observé de translocation et d'invasion dans ce cas présent.

3- Adhérente Invasive *E. coli* (AIEC)

Les *Escherichia coli*, de la famille des *Enterobacteriaceae*, font partie de la classe des protéobactéries. Elles peuvent selon l'espèce être commensales ou pathogènes en fonction des gènes de virulence dont elles disposent et de l'hôte avec lequel elles sont en relation.

L'ensemble des groupes d'*E. coli*, ou pathovars, est remarquable dans sa diversité génétique. Il en découle une grande variété de niches environnementales et d'effets cliniques ce qui en fait un modèle idéal d'étude de l'adaptation et des interactions hôte-pathogène ou hôte-commensale. Il existe deux grands groupes d'*E. coli* pathogènes ; les pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) responsables de méningites, de septicémies ou d'infections urinaires et les pathogènes intestinaux responsables de pathologie entérique (InPEC). On peut de plus classer les pathovars d'*E. coli* intestinaux en fonction de leur phénotype de virulence : les *E.*

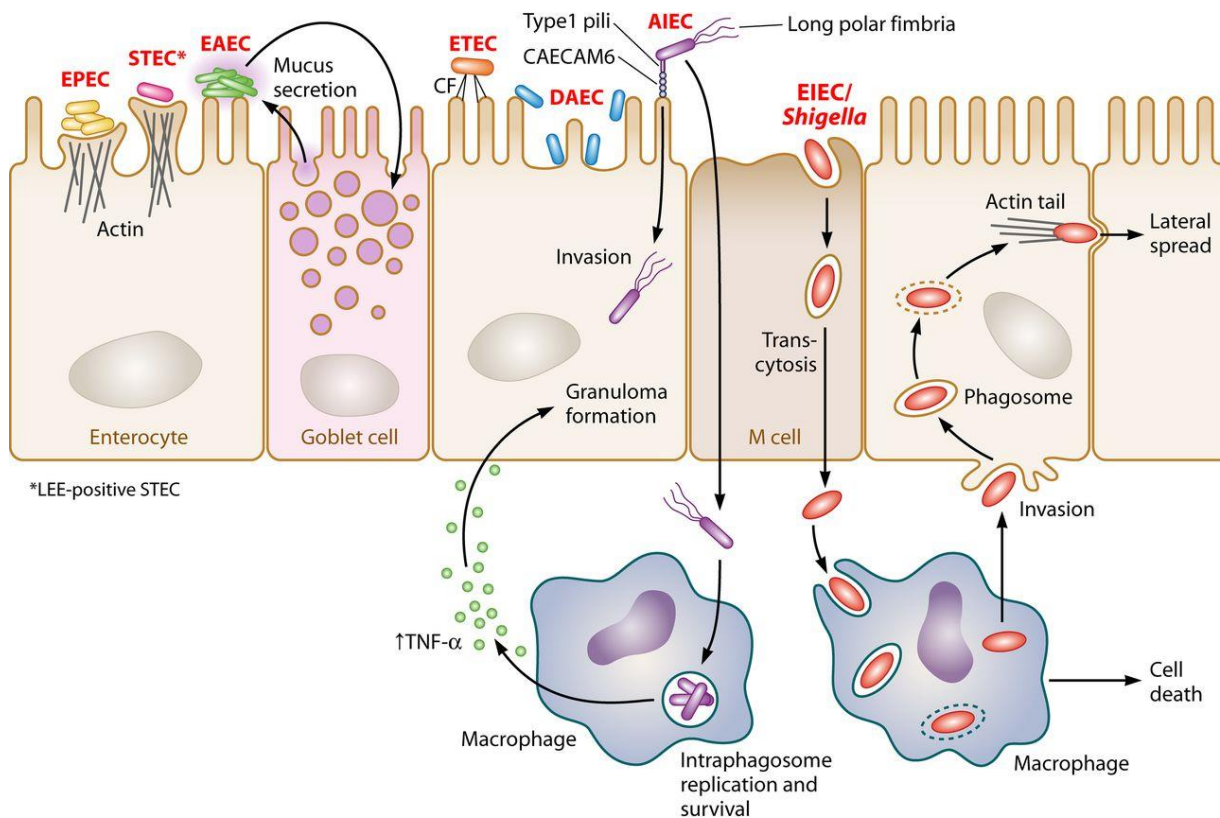


Figure 5 - Profil d'adhérence des *E. coli* pathogènes à l'épithélium de l'hôte. L'*E. coli* entéropathogènes (EPEC) (représentée en jaune) et l'*E. coli* produisant des toxines Shiga (STEC) (représentée en rose) possédant un îlot de pathogénie LEE (Locus of Enterocyte effacement) sont des agents pathogènes extracellulaires qui se fixent à l'épithélium intestinal et effacent les microvillosités, formant ainsi des lésions caractéristiques. EPEC est capable de former des microcolonies grâce à ses pili, ce qui entraîne un modèle d'adhérence localisée. L'*E. coli* entérotoxigène (ETEC) (représentée en orange) utilise des facteurs de colonisation pour la fixation aux cellules intestinales de l'hôte. L'*E. coli* entéro-agrégatif (EAEC) (représenté en vert) forme des biofilms sur la muqueuse intestinale, et les bactéries adhèrent les unes aux autres ainsi qu'à la surface des cellules pour former un motif d'adhérence agrégatif appelé «briques empilées». L'*E. coli* à adhérence diffuse (DAEC) (représentée en bleu) est dispersée sur les surfaces des cellules intestinales, ce qui entraîne un profil d'adhérence diffuse. L'*E. coli* invasif adhérent (AIEC) (représenté en violet) colonise la muqueuse intestinale de patients atteints de la maladie de Crohn et est capable d'envahir les cellules épithéliales ainsi que de se répliquer au sein des macrophages. L'AIEC utilise des *pili* de type I pour adhérer aux cellules intestinales. L'*E. coli* entéroinvasive (EIEC) / *Shigella* (représentée en rouge) est un agent pathogène intracellulaire qui pénètre dans l'épithélium intestinal à travers les cellules M pour accéder à la sous-muqueuse. L'EIEC / *Shigella* échappe aux macrophages sous-muqueux par induction de la mort cellulaire macrophagique suivie d'une invasion basolatérale et d'une propagation latérale (Croxen et al. 2013)

coli entéropathogènes (EPEC), les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), les *E. coli* entéroagrégatifs (EA_gg ou EAEC), les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC), les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), les *E. coli* produisant une toxine Shiga (STEC) et mis en évidence plus récemment les *E. coli* adhérents invasifs (AIEC) (**Figure 5**) (Croxen et al. 2013). Les souches d'*E. coli* pathogènes peuvent être associées phylogénétiquement à 5 groupes principaux qui sont A, B1, B2, D et E.

Les AIEC et plus particulièrement la bactérie LF82, mon modèle d'étude, ont été mises en évidence dans le contexte inflammatoire de la maladie de Crohn (MC). Retrouvées sous sa forme commensale chez des patients sains, elles semblent bénéficier du déséquilibre provoqué par les autres facteurs de risques inhérents à la MC pour coloniser l'intestin des patients (Marks 2011). La colonisation par cette LF82 aggrave l'inflammation. Certains modèles expérimentaux suggèrent que les AIEC peuvent également modifier le microbiote intestinal de l'hôte induisant la colonisation d'espèces microbiennes pro-inflammatoires supplémentaires (Bretin et al. 2018). Il semble au vu des récentes observations que les AIEC sont à la fois une cause et une conséquence de la MC.

La signature génétique associée aux AIEC est répartie dans les groupes phylogénétiques B2 et D. Le classement d'une souche d'*E. coli* comme une AIEC repose sur la capacité de la souche *E. coli* à adhérer et d'envahir les cellules épithéliales pour ensuite survivre dans les macrophages provoquant une réponse inflammatoire (O'Brien et al. 2017; Martinez-Medina, Mora, et al. 2009).

La pathogénicité des AIEC a principalement été étudiée chez la souche de référence LF82. Le génome de l'AIEC LF82 a été entièrement séquencé, 115 CDS ont été identifiés comme spécifiques du génome de LF82 et n'ont pas été retrouvés chez les autres souches d'*E. coli*. De plus, 15 CDS n'ont aucune homologie avec aucun genome de bactérie pathogène à ce jour. (Miquel, Peyretailade, et al. 2010a). La souche LF82 possède quatre îlots de pathogénicité caractérisés comprenant deux appareils de sécrétion de type VI, un îlot codant les éléments d'une capsule et un îlot d'acquisition du fer similaire au « High pathogenicity Island » des *Yersinia*. En plus de ces îlots, LF82 possède plusieurs facteurs de virulence connus, nécessaire pour l'adhésion, l'invasion des cellules épithéliales, l'acquisition du fer, le catabolisme du propanediol. Cependant à ce jour, le pouvoir pathogène de la bactérie LF82

est associé aux gènes *fimH*, *ompA*, *htrA* et *dsbA* présents sur le génome cœur des souches d'*E. coli*. De nombreuses AIEC présentent une mutation au niveau du gène *fimH* leur permettant une adhésion renforcée au niveau des cellules épithéliales, on parle ici d'une mutation pathoadaptative.

Partie 3 : Infection des cellules épithéliales de la barrière intestinale par les AIEC

Le tractus intestinal représente le plus grand organe immunitaire du corps, la barrière intestinale constitue la première ligne de défense contre les agressions extérieures. Elle est composée d'un riche microbiote constitué, comme mentionné précédemment, majoritairement de bactéries de mucus et de cellules épithéliales intestinales. Elle fait également intervenir une barrière immunologique composée principalement de cellules immunocompétentes comme les lymphocytes, les macrophages, les plasmocytes et les cellules dendritiques permettant la présentation d'antigène donnant lieu à la tolérance du système immunitaire ou bien à sa réponse rapide en cas d'agression ou encore à la sécrétion de médiateurs inflammatoires (Berin, Li, et Sperber 2006) **(Figure 6)**. Les AIEC présentent la particularité de franchir l'ensemble de ces barrières. Les connaissances dans ce domaine sont principalement issues de travaux sur LF82. Dans les paragraphes suivants, j'étends leurs conclusions aux AIEC, mais il faut garder en mémoire qu'étant donné leur diversité génétique les mécanismes moléculaires pourraient varier entre les souches d'AIEC.

1 Mucus

Le mucus est produit à la surface des cellules épithéliales du tractus par les cellules caliciformes (ou gobelet), il constitue une barrière physique, chimique et immunologique. Il contient des immunoglobulines A (IgA) qui vont venir se fixer sur les pathogènes et des peptides antimicrobiens qui vont permettre la destruction de la membrane des micro-organismes. Le mucus peut être séparé en deux zones distinctes. La première couche interne en contact avec les cellules épithéliales; elle est dense et aucune bactérie commensale ne s'y trouve. La deuxième couche est en contact avec la lumière intestinale; moins ferme elle permet au bol alimentaire d'avancer dans le tractus intestinal et présente une source nutritionnelle pour les bactéries commensales. (Branca, Gulisano, et Nicoletti 2019).

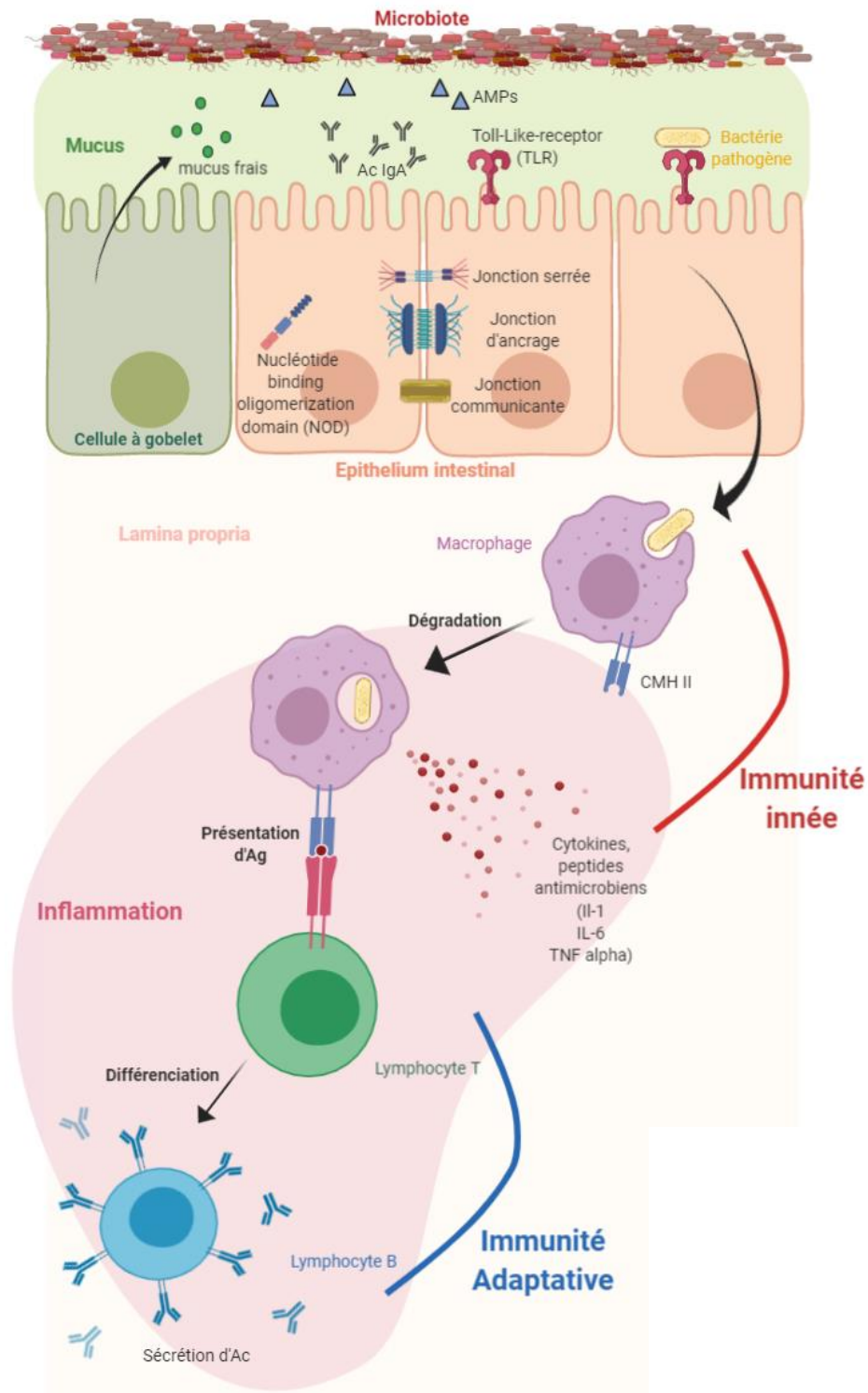


Figure 6 - Défenses de la barrière intestinale. Les défenses composant la barrière intestinale sont multiples ; le microbiote, le mucus, les Ac IgA, les peptides antimicrobiens (AMP), les multiples récepteurs de l'immunité innée exprimés par les cellules épithéliales intestinales comme les TLR ou les NOD, les différentes jonctions maintenant la perméabilité. Dans la *lamina propria* des macrophages et cellules dendritiques circulants peuvent phagocyter les pathogènes ayant réussi à passer la barrière épithéliale et activer l'immunité innée par présentation d'Ac au Lymphocyte T *via* le CMH de classe 2 et le CD4. Cette activation provoque ensuite la différenciation des lymphocytes B pour produire une réponse adéquate aux *stimuli* rencontrés.

1-1 Traversée du mucus par LF82

Pour accéder aux cellules épithéliales et coloniser la niche intestinale, LF82 doit traverser la couche de mucus normalement impénétrable. Le gène Vat-AIEC code pour une protéase effectuant un clivage protéolytique des mucines (protéines de grandes tailles) et joue un rôle dans la diminution de la viscosité du mucus, permettant la pénétration des AIEC. La présence de sels biliaires agit comme signal déclencheur de l'expression de Vat-AIEC (Gibold et al. 2016).

1-2 formation de biofilm extracellulaire par LF82

Dans un environnement intestinal sain et non enflammé les bactéries du microbiote intestinal forment des structures de type biofilm dans la couche externe du mucus. Dans un état inflammatoire, déclenché par une pathologie, le mucus altéré peut offrir la possibilité aux bactéries d'établir un biofilm directement à la surface des cellules épithéliales, stimulant plus fortement les cellules intestinales et facilitant l'invasion. Dans le cas de la MC, la densité du biofilm muqueux observé était deux fois plus élevée que celle d'un patient sain (Swidsinski et al. 2005). Les AIEC sont des gros producteurs de biofilms en comparaison aux autres souches d'*E. coli* (Martinez-Medina, Naves, et al. 2009). L'activation du facteur sigma alternatif σ^E de fonction extracytoplasmique a un effet direct sur la virulence des AIEC dans la lumière intestinale. L'utilisation de la voie σ^E permet la réponse aux stress environnementaux affectant l'enveloppe. L'activation de cette voie est nécessaire pour l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales, il a également été démontré son implication dans la formation de biofilm facilitant l'adhérence aux cellules épithéliales (Chassaing et Darfeuille-Michaud 2013). Nous y reviendrons plus en détail dans la quatrième partie de cette introduction qui sera exclusivement consacrée à la formation de biofilm comme stratégie de colonisation.

2 La colonisation des cellules épithéliales

Pendant longtemps considéré comme étant une barrière passive, il a été mis en évidence durant ces deux dernières décennies que l'épithélium intestinal jouait un rôle actif sur

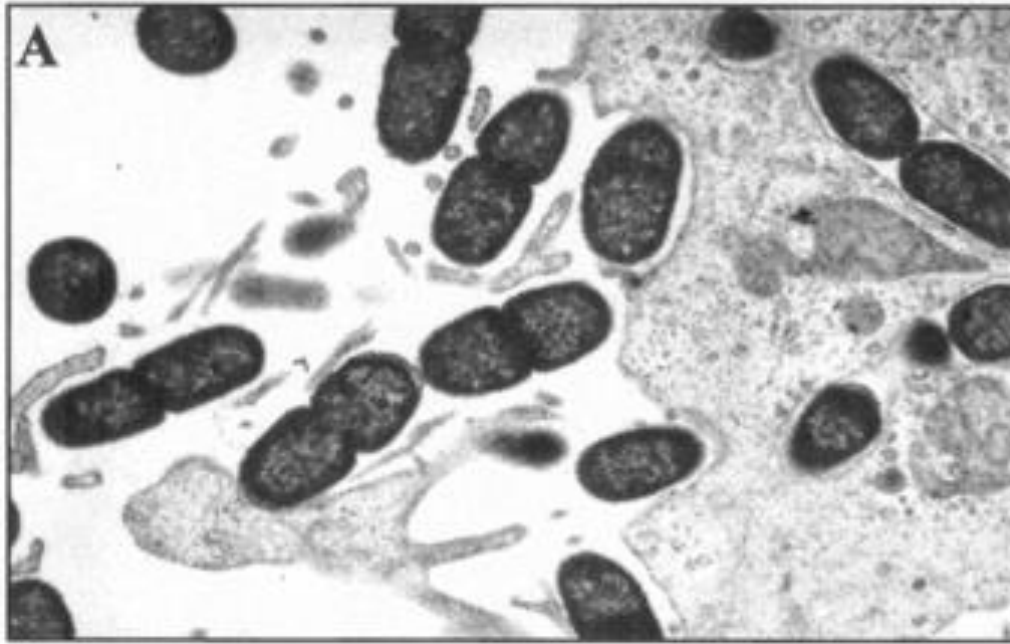


Figure 7 - Microscopie électroniques à transmission des cellules intestinale-407 infectées par la souche LF82.
La souche LF82 adhère aux cellules Intestial-407 et induisent l'élongation des extensions de la membrane lors du contact avec les cellules eucaryotes. Grossissement $\times 6\ 000$. (Rolhion et al. 2005)

l'homéostasie intestinale et qu'il constituait en réalité une interface dynamique. L'intégrité de la barrière intestinale est assurée par la membrane plasmique imperméable et les jonctions entre cellules. Parmi elles, les jonctions serrées, les jonctions d'ancrages et les jonctions communicantes verrouillent l'espace paracellulaire (Zouiten-Mekki et al. 2013).

-Les jonctions serrées: elles interviennent dans le maintien de la cohésion des cellules entre elles et régulent la perméabilité intestinale en bloquant le passage aux protéines ou aux lipides. En faisant cela, elles permettent le maintien de deux environnements de compositions moléculaires très différentes induisant la polarité des cellules : le pôle apical en contact avec la lumière de l'intestin et le pôle basal en contact avec la *lamina propria*.

-Les jonctions d'ancrages: positionnées en dessous des jonctions précédentes au niveau du pôle basal des cellules, elles permettent une jonction continue de contacts intracellulaires.

-Les jonctions communicantes: elles ont un tout autre rôle puisqu'elles permettent le passage de molécules entre cellules adjacentes par exemple des seconds messagers intracellulaires (calcium, AMPc).

2-1 Facteurs d'adhésion aux cellules épithéliales de LF82

2-1-1 Pili

Les *E. coli* commensaux n'ont pas la capacité d'adhérer aux cellules épithéliales intestinales contrairement aux souches du groupe des AIEC qui adhèrent à un large éventail de cellules épithéliales. Les AIEC utilisent leur pili de type 1 pour adhérer puis induire un processus ressemblant à la macropinocytose (**Figure 7**). L'adhésion des AIEC aux cellules provoque un réarrangement du cytosquelette entraînant un allongement d'extensions membranaires de la cellule au point de contact de la bactérie (Jérôme Boudeau, Barnich, et Darfeuille-Michaud 2001). Le pili de type I fait partie des facteurs de virulence bactérien, c'est l'un des organites adhésifs les plus répandus dans la famille des *Entérobactéries*. C'est une structure filamenteuse exprimée à la surface des bactéries de façon péritriche. La structure de ces organites est composée d'une tige hélicoïdale principalement composée de la sous-unité FimA (Schilling, Mulvey, et Hultgren 2001). L'extrémité de cette tige est décorée des deux

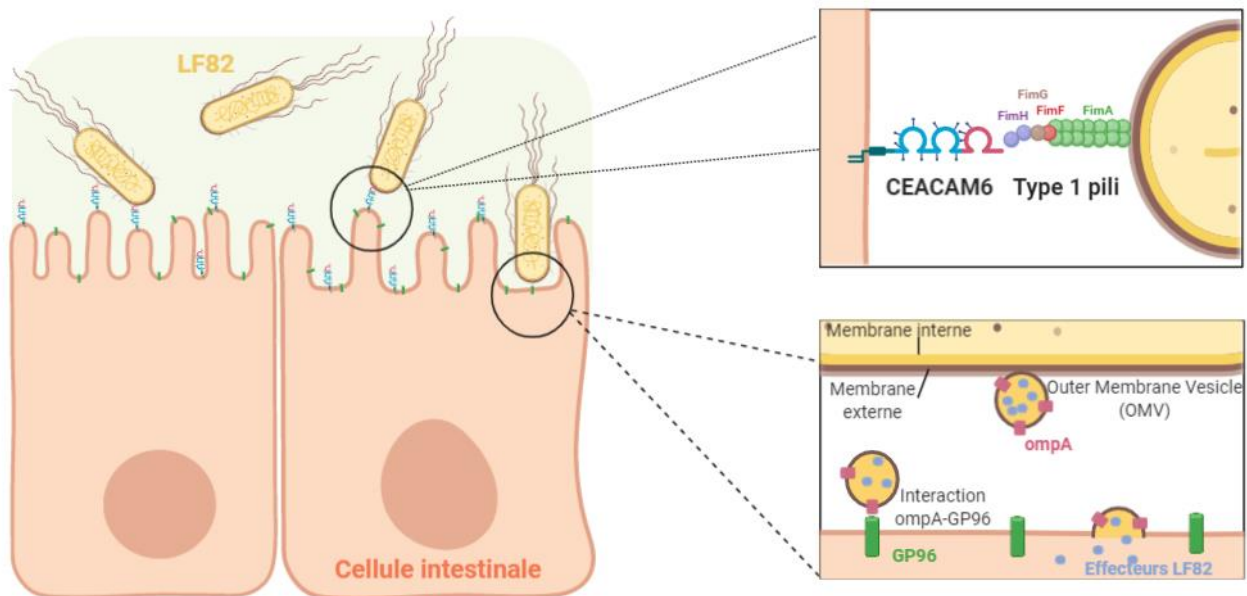


Figure 8 - Adhésion de la bactérie LF82 aux cellules épithéliales intestinales. Les bactéries LF82 utilisent leur *pilus* de type 1 pour adhérer à l'antigène CEACAM6 exprimé à la surface des cellules épithéliales et surexprimé chez les patients atteints de la maladie de Crohn. Le deuxième facteur d'adhérence et d'invasion est la création de vésicules de membranes externes. LF82 interagit *via* OmpA avec les protéines GP93 des cellules épithéliales pour fusionner avec la membrane cellulaire et libérer des effecteurs bactériens favorisant l'invasion.

protéines adaptatrices FimG et FimF et de l'adhésine FimH. L'adhésine FimH permet la reconnaissance des oligosaccharides à haute teneur en mannose, présents sur les glycoprotéines exprimées à la surface des cellules épithéliales (Kolenda, Ugorski, et Grzymajlo 2019). Les UPEC (*Escherichia coli* uropathogènes) envahissent également les cellules épithéliales de la vessie *via* FimH et c'est le seul facteur nécessaire pour l'adhésion et l'invasion bactérienne. Lorsque le pili de type 1 de LF82 est exprimé chez un *E. coli* K12, il ne suffit pas à augmenter l'adhésion aux cellules épithéliales. Cela sous-entend l'implication dans LF82 d'autres facteurs nécessaires à l'adhésion. (Barnich et al. 2007; Jérôme Boudeau, Barnich, et Darfeuille-Michaud 2001).

Le pili de type I de LF82 se fixe préférentiellement à la surface des cellules épithéliales sur le récepteur CEACAM6 (molécule d'adhésion cellulaire liée à l'antigène carcino-embryonnaire) glycosylé (**Figure 8**). CEACAM6 est surexprimé à la surface des cellules épithéliales de l'iléon des patients atteints de la MC sous l'influence de deux facteurs ; la présence des AIEC et la production de cytokines pro-inflammatoire IFN- γ et TNF- α (Barnich et al. 2007; Fahlgren et al. 2003). Le rôle normal de CEACAM6 pourrait être celui de leurre envers les bactéries pathogènes. Des vésicules contenant CEACAM6 peuvent être sécrétées de façon dynamique dans le mucus renouvelant ainsi constamment ce point d'attache. L'objectif serait d'empêcher ainsi les bactéries pathogènes d'atteindre les microvillosités des cellules épithéliales (Hammarström et Baranov 2001). Cette étape, la bactérie LF82 semble l'avoir détournée à son avantage en se fixant très efficacement. La colonisation de la muqueuse iléale des patients atteints de la maladie de Crohn pourrait ainsi être encouragée par la présence de cet antigène et créer une boucle de régulation positive, la présence des AIEC colonisant la muqueuse en absence de récepteur NOD2 induisant l'inflammation qui permet ensuite une surexpression additionnelle de CEACAM6.

2-1-2 Flagelle

Le flagelle est également un facteur de virulence nécessaire pour l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales par LF82. Ce facteur pourrait jouer des rôles multiples; il permettrait la mobilité active de la bactérie pour accéder aux cellules épithéliales, mais aurait également un rôle plus subtil. En effet son expression semble associée à l'expression de divers facteurs

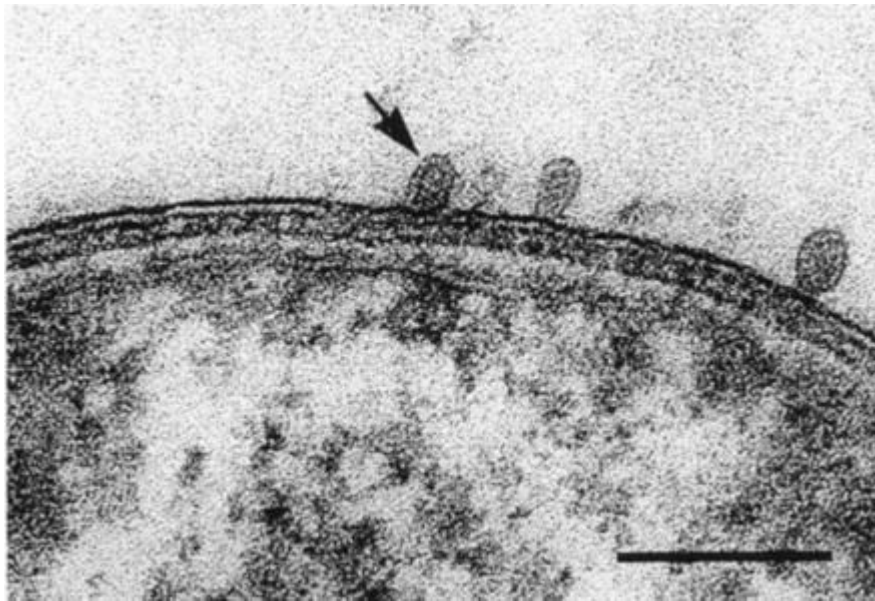


Figure 9 - Coupe fine de *P. aeruginosa* PAO1 montrant le développement des OMV avant qu'ils ne soient libérés de la cellule. La flèche indique une vésicule dans laquelle on peut voir la bicouche membranaire et le périplasma dans sa lumière (c'est-à-dire la zone dense en électrons à l'intérieur de la vésicule). Barre = 250 nm. (Beveridge 1999)

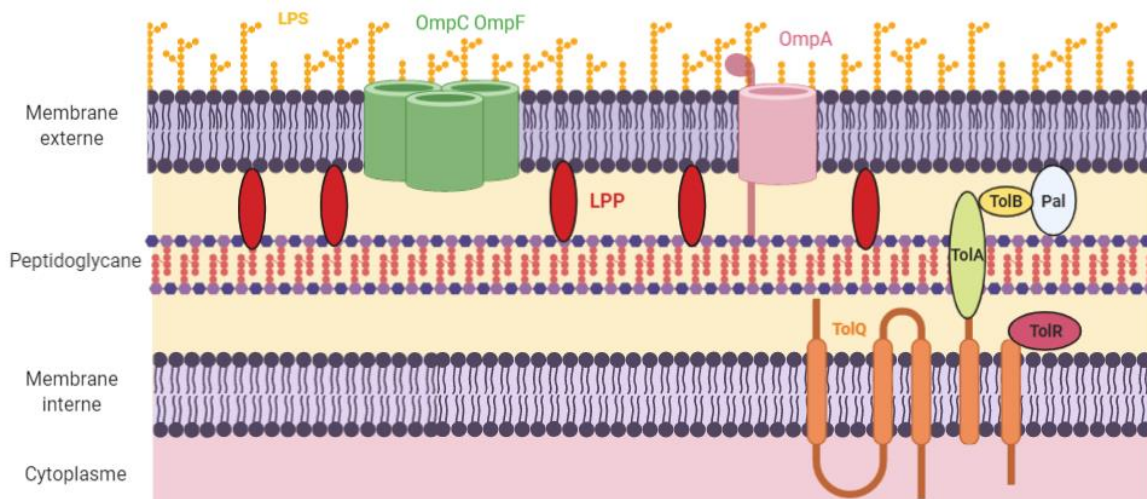


Figure 10 - Organisation de la membrane des bactéries Gram négatives : Stabilisation de l'enveloppe grâce aux protéines OmpA et LPP interagissant avec le peptidoglycane et la membrane externe et le complexe Tol/Pal interagissant avec le peptidoglycane et la membrane interne

de virulences et notamment celle du *pili* de type I. Des mutations dans le gène *fliC* du flagelle ont diminué par 5 la capacité à envahir les cellules de l'intestin par rapport à celle d'une souche sauvage (Barnich et al. 2003). Le régulateur de transcription FlhDC de l'opéron flagellaire régule également l'opéron du *pili*, en son absence les *pili* seraient régulés à la baisse. Ainsi un mutant du flagelle affecte la capacité d'expression du *pili* de type I. À l'inverse, l'absence de *pili* n'affecte pas l'expression du flagelle (Barnich et al. 2003). Le flagelle de LF82 est également nécessaire pour l'inflammation, il induit fortement la sécrétion par les cellules épithéliales des cytokines IL-8 et CCL20, chimio-attractives, qui permettent le recrutement et la migration des cellules immunitaires (Eaves-Pyles et al. 2008).

2-1-3 OMV

Les vésicules de membranes externes (OMV) sont des sphères d'enveloppe cellulaire apparaissant de manière dynamique à la surface externe uniquement des bactéries Gram négatives. Elles subissent ensuite une fission puis se détachent de la bactérie sécrétrice (**Figure 9**) (Schwechheimer et Kuehn 2015). Les OMV ont de multiples rôles, les bactéries les utilisent principalement pour modifier leur environnement. Les OMV peuvent permettre l'acquisition d'élément nutritif comme le fer, réguler des interactions bactériennes et interviennent également dans la pathogénicité en contenant certains facteurs de virulence. Les bactéries Gram négatives possèdent deux membranes, la membrane cytoplasmique et la membrane externe séparées par une couche de peptidoglycane située dans l'espace périplasmique (Silhavy, Kahne, et Walker 2010). L'enveloppe est stabilisée grâce aux liaisons croisées entre la lipoprotéine de Braun (Lpp) et le peptidoglycane, entre le peptidoglycane et OmpA et entre le peptidoglycane et le complexe TolPal (lipoprotéine associée au peptidoglycane) (**Figure 10**). Les OMV sont formés à partir de la membrane externe et contiennent du périplasme et certains de ses composants. La biogenèse de ces vésicules est un processus de sécrétion enclenché par la bactérie et non pas un événement stochastique (Schwechheimer et Kuehn 2015). *E. coli* et *Salmonella* produisent de façon accrue des OMV, capacité augmentée lorsque la température augmente probablement due au fait de l'augmentation de la fluidité de la membrane (McBroom et Kuehn 2007). Dans le cas de LF82 la sécrétion d'OMV permet la libération des protéines OmpA et OmpB.

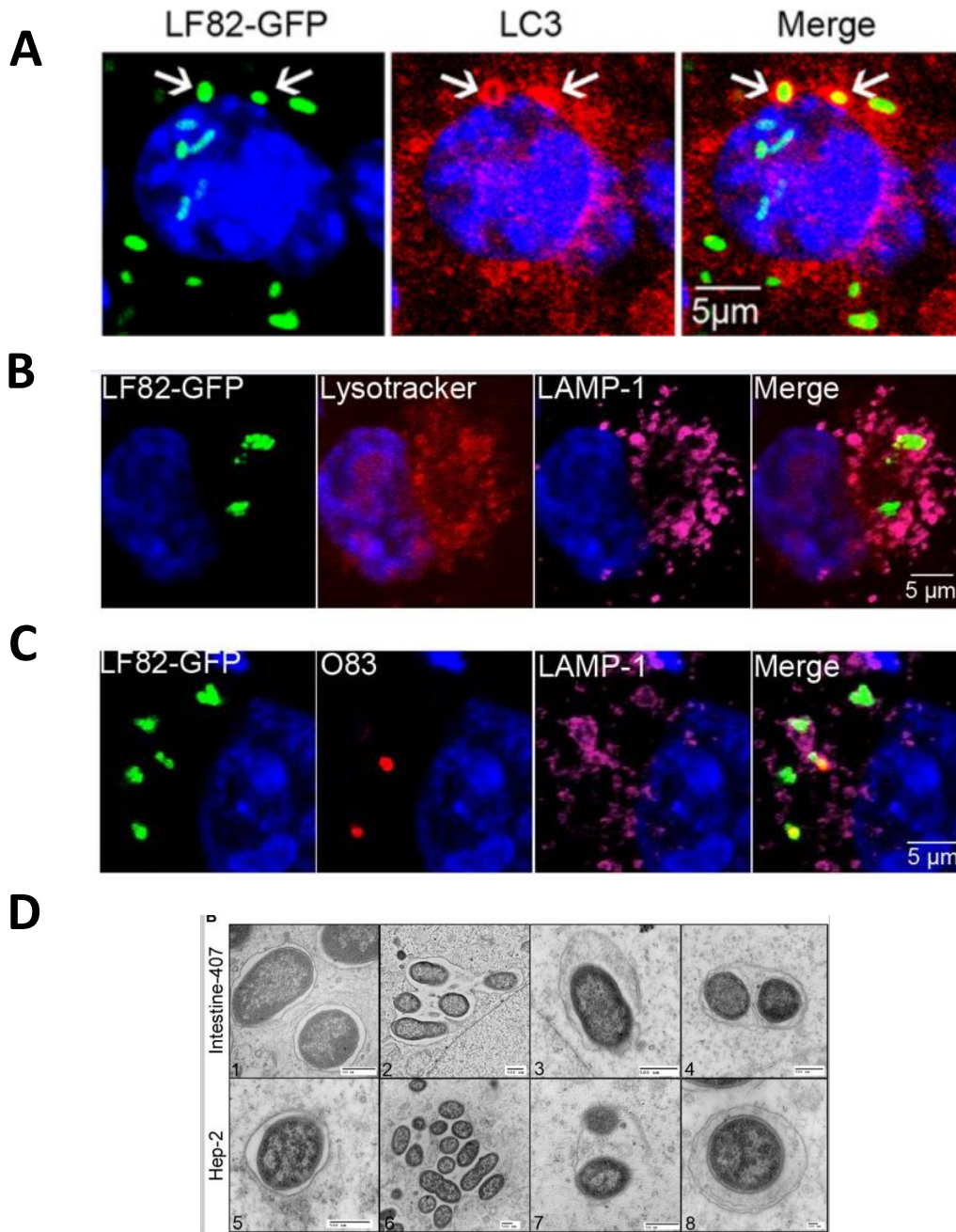


Figure 11 - Les bactéries AIEC LF82 interagissent avec l'autophagie dans des lignées de cellules épithéliales. **A-** Image au microscope confocal des cellules épithéliales MEFs infectées par l'AIEC LF82-GFP 6 heures après l'infection pour analyser la colocalisation avec LC3 en utilisant un anticorps monoclonal anti-LC3 (rouge). Les noyaux sont en bleu. **B -** Microscopie confocale de cellules épithéliales HeLa infectées par AIEC LF82-GFP 6 heures après l'infection, marquées par le lysotracker (rouge) et par LAMP-1 (violet) pour visualiser les vacuoles. **C-** Analyse en microscopie confocale après perméabilisation de la membrane plasmique par la digitonine, marquage de l'AIEC LF82 cytosolique libre avec les anticorps O83 (rouge), et marquage des vacuoles avec les anticorps LAMP-1 (violet). **D-** Analyse ultrastructurale de cellules épithéliales Intestine-407 et Hep-2 infectées par la souche AIEC LF82 pendant 6 h par microscopie électronique à transmission montrant divers compartiments intracellulaires pour la bactérie LF82 intracellulaire: bactérie isolée dans des vacuoles à membrane monocouche (1 et 5), plusieurs bactéries dans une seule membrane (vacuole) (2 et 6), bactéries dans des vacuoles endommagées (3 et 7) et bactéries dans une vacuole à membrane multi-lamellaires contenant également un cytoplasme séquestré (4 et 8). (Lapaquette et al. 2010)

OmpA favoriserait la fusion des OMV aux récepteurs Gp93 présents à la surface des cellules épithéliales (**Figure 8**) (Rolhion, Hofman, et Darfeuille-Michaud 2011; Rolhion et al. 2005). Ce processus favoriserait la fixation et l'invasion des cellules épithéliales par LF82. Gp96 est par ailleurs surexprimée chez 50% des patients en phase aiguë de la MC contre 34% des patients en phase quiescente (Rolhion, Hofman, et Darfeuille-Michaud 2011). Les OMV de LF82 pourraient également contenir d'autres facteurs de virulence nécessaires à l'invasion. En prétraitant des cellules épithéliales avec des OMV purifiées à partir de LF82, on a observé une augmentation de l'invasion par un LF82 mutant qui lui ne produit pas de OMV (Rolhion et al. 2005).

2-2 Perturbation de la monocouche épithéliale

LF82 est également capable d'altérer la fonction de la barrière épithéliale en désorganisant la F-actine, en diminuant la quantité de ZO-1 (Zonula occludens-1, une protéine nécessaire à la formation de jonctions apicales étroites) et l'E-cadhérine (Wine et al. 2009). Cela induit une perméabilisation des jonctions des cellules épithéliales de la barrière intestinale chez les patients atteints de la MC permettant la diffusion de LF82 (Wine et al. 2009).

La surproduction de cytokines pro-inflammatoire comme le TNF- α est un des facteurs clés associés à la MC. LF82 induit une stimulation de cette production de cytokines (Glasser et al. 2001). C'est un moyen très efficace d'activer et de recruter les macrophages sur le lieu de l'infection, mais la production de cette cytokine désorganise également fortement la fonction barrière des cellules intestinales (Sasaki et al. 2007). Cette diminution de l'intégrité de la barrière épithéliale entraîne une translocation accrue des AIEC.

2-3 Réplication dans les cellules épithéliales intestinales :

Dans les cellules épithéliales, la bactérie LF82 peut se multiplier dans différents compartiments. LF82 est retrouvée libre dans le cytoplasme ou associée à des vacuoles marquées par Lamp1 associées au lysosomes, ou des vacuoles marquées par LC3, un marqueur de l'autophagie (**Figure 11**) (Lapaquette et al. 2010; Jerome Boudeau et al. 1999). Les bactéries présentes dans ces compartiments LC3 ne sont pas capables de se multiplier,

de plus, il a été démontré que la déficience en autophagie confère un avantage répliatif aux AIEC. L'induction de l'autophagie par un traitement à la rapamycine augmente le nombre de bactéries dans les compartiments positifs pour LC3 et diminue le nombre de bactéries intracellulaires (Lapaquette et al. 2010). Par ailleurs certains patients atteints de la MC peuvent présenter un défaut d'autophagie lié aux gènes ATG16L1 et IRGM. On peut penser que cela va favoriser la multiplication intracellulaire des AIEC.

La bactérie elle-même peut inhiber l'autophagie (H. T. T. Nguyen et al. 2014). En effet, lors de l'infection des cellules épithéliales, il a été démontré que LF82 active la voie Nf-kB entraînant une régulation à la hausse d'une microARN régulateur ce qui réduit le niveau des gènes ATG16L1 et IRGM associé à l'autophagie (Conte et al. 2016, 82) (Jarry et al. 2015).

Partie 4 : Infection des Macrophages par LF82

1- Caractéristiques générales

Les macrophages ont un rôle décisif dans l'immunité, en internalisant certains microorganismes, ils permettent l'orchestration d'une réponse immunitaire appropriée. Décrit pour la première fois par E. Metchnikoff dans les années 1880 (Tauber 2003), la phagocytose utilisée par les macrophages consiste en l'internalisation de particules cibles. Cette découverte est à l'origine du concept innovant d'immunité cellulaire (Prix Nobel en 1908).

Le rôle le plus fréquent des macrophages est de digérer des nutriments ou des cellules apoptotiques (phagoptose) (G. C. Brown, Vilalta, et Fricker 2015), mais ce mécanisme peut également être mis en place pour dégrader des microorganismes tels que les bactéries. Ce processus cytotoxique se découpe en plusieurs étapes aboutissant à la destruction du microorganisme et permettant dans la plupart des cas, la présentation d'antigène aux lymphocytes T *via* le complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II). Les macrophages sécrètent l'Interleukine-1 permettant la prolifération des lymphocytes T, de l'interleukine 6, du TNF α et d'autres chimiokines (Yang et Richmond 2009).

Cette combinaison dégradation-présentation-sécrétion entraîne une boucle d'activation en recrutant sur le lieu de l'infection de nouvelles cellules de l'immunité innée telles que des monocytes, des neutrophiles, des éosinophiles et des basophiles dans la circulation (Iwasaki et Medzhitov 2015) (Benihoud et al. 2007). En parallèle intervient l'initiation de la réponse immunitaire adaptative *via* les lymphocytes T (**Figure 6**). Le rôle du macrophage est donc central dans l'initiation de la réponse immunitaire. En plus des macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les cellules dendritiques, les ostéoclastes et les éosinophiles peuvent également effectuer la phagocytose aboutissant au déclenchement de la réponse immunologique *via* la présentation d'antigène (BoseDasgupta et Pieters 2018). Il existe également des cellules phagocytaires non professionnelles qui ne vont pas aboutir à la présentation d'antigènes, mais qui jouent un rôle important dans l'élimination des corps apoptotiques ; les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Rosales et Uribe-Querol 2017).

2- Cas particulier des macrophages du tractus intestinal

Depuis de nombreuses années, les études ont principalement été effectuées *in vitro*, sur des macrophages différenciés de cellules de la moelle osseuse de souris, dans un contexte d'infection mais qui ne reflètent pas la diversité phénotypique de ce type cellulaire. Jusqu'alors peu étudié, les macrophages dérivés des monocytes présents en sentinelle dans la *lamina propria* du tractus intestinal, présentent quelques différences phénotypiques et fonctionnelles avec les autres macrophages. Leur emplacement stratégique leur confère un double rôle de protection contre les agents pathogènes et de régulation de la réponse vis-à-vis des bactéries commensales. Ils sont capables de phagocyter les pathogènes, mais semblent inhiber le processus inflammatoire. Pour cela, ils n'expriment pas de récepteur à la réponse innée qui permet habituellement la reconnaissance des bactéries, ne produisent pas de cytokines pro-inflammatoires (Smythies et al. 2005) et fabriquent en continu de l'interleukine 10 qui a un rôle direct dans l'immunosuppression (Denning et al. 2007). Cette interleukine intervient également dans la réparation et la prolifération des cellules épithéliales (Quiros et al). Ce mécanisme participe à la tolérance immunitaire indispensable dans ce type de tissu en contact constant avec un grand nombre de bactéries permettant ainsi le maintien de l'homéostasie du tractus intestinal. Cette « anergie inflammatoire » des macrophages se fait par l'intermédiaire des cellules stromales intestinales qui régulent négativement l'expression des récepteurs des monocytes et la production de cytokines *via* le TGF- β (Smythies et al. 2005). L'altération de leur capacité de reconnaissance et de sécrétion n'affecte cependant en rien leur capacité à phagocyter et à détruire les bactéries qui passent la barrière intestinale.

La surveillance et l'activation de l'inflammation au niveau de la barrière intestinale en cas d'infection sont assurées par les macrophages exprimant à la surface un récepteur de liaison de l'acide sialique CD169 (Hiemstra et al. 2014). Ce récepteur fait partie de la famille des lectines et se lie préférentiellement aux acides sialiques présents notamment sur les surfaces microbiennes. Son affinité est faible, mais la multiplication des liaisons est suffisante pour induire une réponse. Ces macrophages CD169+ sont habituellement observés dans des zones riches en lymphocytes B et T qui induisent rapidement leur activation en cas de rencontre avec un pathogène. La *lamina propria* est, elle, dans l'ensemble majoritairement

occupée par des macrophages CD169-, mais il a été récemment observé la présence de macrophages CD169+ capable de produire, suite à une lésion au niveau de la muqueuse, la cytokine CCL8 (chemokine C-C motif ligand 8). La sécrétion de CCL8 agit comme un signal d'alerte et permet la mise en place sur le lieu de l'agression du processus inflammatoire, ainsi que le recrutement de cellules immunitaires dont des macrophages ayant des capacités inflammatoires (Rugtveit et al. 1994). Ce mécanisme permet à la fois un contrôle du déclenchement de l'inflammation et une grande tolérance nécessaire due à la proximité des bactéries immunostimulantes du tractus intestinal.

3- Phagocytose

Les étapes de la phagocytose peuvent être classées chronologiquement:

- **Reconnaissance** : Les récepteurs de la membrane plasmique reconnaissant la cible à phagocyter peuvent être de deux types ;

-Oponique : reconnaissant les opsonines dérivées de l'hôte liées à la cible phagocytaire tel que les anticorps ou les protéines du complément.

-Non-opsonique: permettent la reconnaissance des groupes moléculaires directement à la surface de la cible.

Ces deux catégories de récepteurs sont aussi appelées PRR (récepteur de reconnaissance de forme) et reconnaissent les PAMPs (pathogen associated molecular pattern) qui sont des motifs conservés chez les bactéries ou les virus (Medzhitov 2007) (**Tableau 1**).

- **Internalisation** : Une fois la cible identifiée, des événements de signalisation sont déclenchés qui induisent un remodelage important de la membrane par l'intermédiaire du cytosquelette d'actine. L'ingestion se fait par dépression de la membrane au niveau du point de reconnaissance de la bactérie et formation de pseudopodes par la membrane macrophagique. S'ensuivent l'entrée et la formation d'une vacuole de phagocytose appelée phagosome.

PRR	PAMP	Localisation
Récepteur scavenger	LDL, LPS	Membrane plasmique
Mannose récepteur	Mannose	Membrane plasmique
TLR2	peptidoglycane	Membrane plasmique
TLR4	lipopolysaccharides	Membrane plasmique
TLR3	ARN double brin (virus)	Endosome
TLR7, TLR 8	ARN simple brin (virus)	Endosome
RIG-1 like helicase	ARN double brin (virus)	Cytosol
Nod-like-receptor (NLR)	Paroi bactérienne, motifs bactériens, signaux de dangers endogènes	Cytosol

Tableau 1 - Tableaux des principaux PRR et nature des ligands.

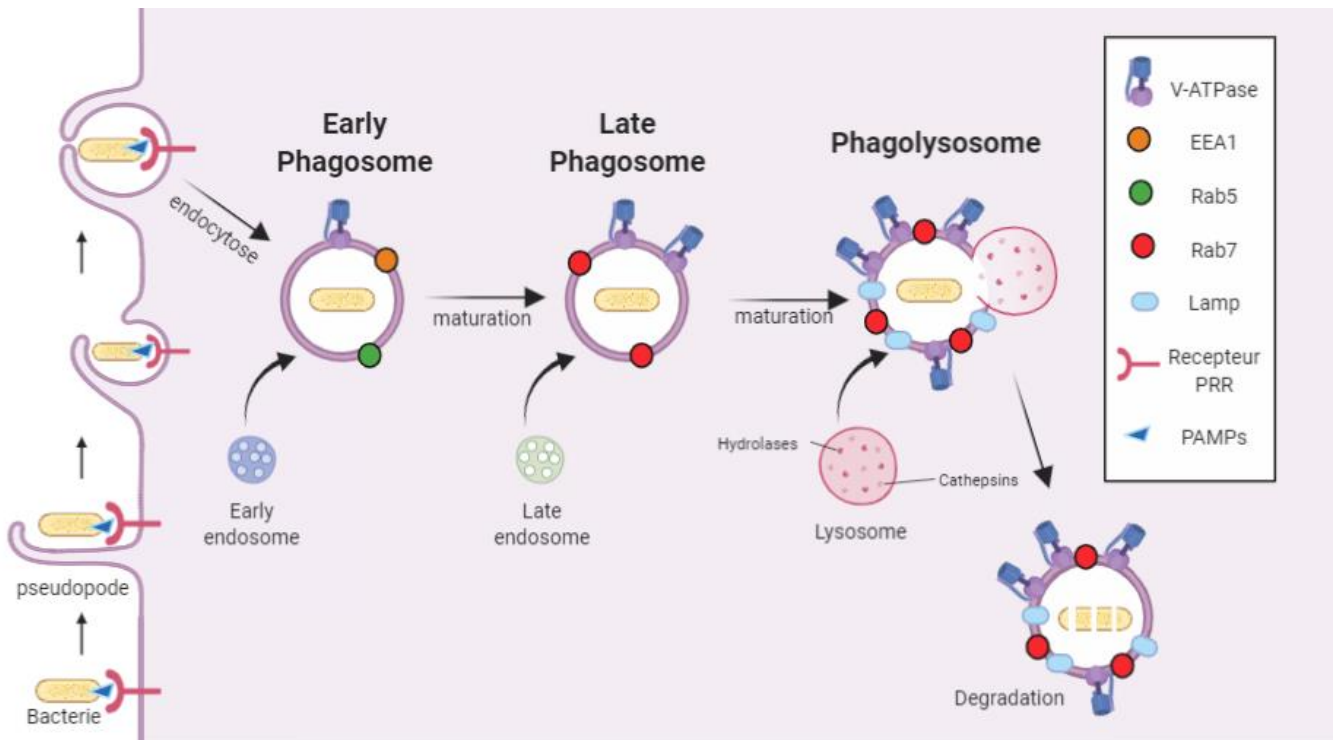


Figure 12 - Maturation du phagosome. Après la reconnaissance et l'internalisation de la bactérie, le phagosome va subir différentes étapes de maturation par fusions successives avec des endosomes précoces, tardifs et des lysosomes. Les pompes V-ATPase contribuent à l'acidification de la vacuole et au bon fonctionnement des enzymes hydrolytiques contenues dans les phagolysosomes finaux entraînant une dégradation de la bactérie.

- **Maturation** : Le phagosome contenant la cible à dégrader va modifier rapidement sa composition membranaire et son contenu vacuolaire. Il va ainsi mûrir en fusionnant avec des endosomes précoces, des endosomes tardifs et des lysosomes (**Figure 12**).

La première étape de fusion avec les endosomes précoces permet l'acquisition de la GTPase Rab5 régulant les événements de fusion. Dès cette première étape, on observe un début d'acidification du contenu de la vacuole, à un pH compris entre 6,1 et 6,5, par acquisition et activation de pompes à proton, « vacuolar-type ATPase » (V-ATPase) (Sun-Wada et al. 2009; Uribe-Querol et Rosales 2017).

La vacuole perd ensuite la GTPase Rab5 pour acquérir Rab7 qui permet la fusion avec les endosomes tardifs. Les pompes V-ATPase s'accumulent à la surface de la vacuole acidifiant le contenu à un pH compris entre 5,5 et 6 (Kinchen et Ravichandran 2008).

L'étape finale de ce processus de maturation est la fusion avec les lysosomes. Les lysosomes possèdent des protéines LAMP (protéines membranaires associées aux lysosomes), accumulées à la membrane lysosomale, elles permettent la fusion phagosome-lysosome (Huynh et al. 2007). Les lysosomes contiennent plus de 50 enzymes hydrolytiques (phosphatases, nucléases, glycosidases, protéases, peptidases, sulfatases et lipases), ils contiennent également un grand nombre de pompes à protons et permettent l'acidification du phagolysosome jusqu'à un pH de 4,5. Le processus d'acidification va limiter la prolifération du pathogène et permet une activité optimale des enzymes digestives. L'acidification de ce compartiment favorise également la production par la NADPH oxydase de peroxyde d'hydrogène et autres espèces réactives de l'oxygène aboutissant à la dégradation finale de la cible phagocytée. L'oxyde nitrique (NO) est synthétisé au niveau des phagosomes du côté cytoplasme et diffuse dans la vacuole (Webb et al. 2001). Le phagolysosome limite également la présence d'éléments nutritifs en injectant des capteurs de nutriments dans la lumière phagolysosomale. La lactoferrine, par exemple, séquestre le fer essentiel à la croissance de certaines bactéries. Une autre stratégie est d'éliminer la présence des nutriments de la vacuole par l'insertion de transporteur à la membrane phagolysosomale comme la Nramp1 qui évacue les cations divalents comme le Fe²⁺, Zn²⁺ et le Mn²⁺ (cofacteurs d'enzymes microbiennes) de la lumière du phagolysosome (Flannagan, Cosío, et Grinstein 2009) (**Figure 13**).

Le déroulement d'une phagocytose n'est pas dogmatique et peut être plus ou moins efficace en fonction des conditions. Par exemple, la capacité à fusionner avec les lysosomes et la

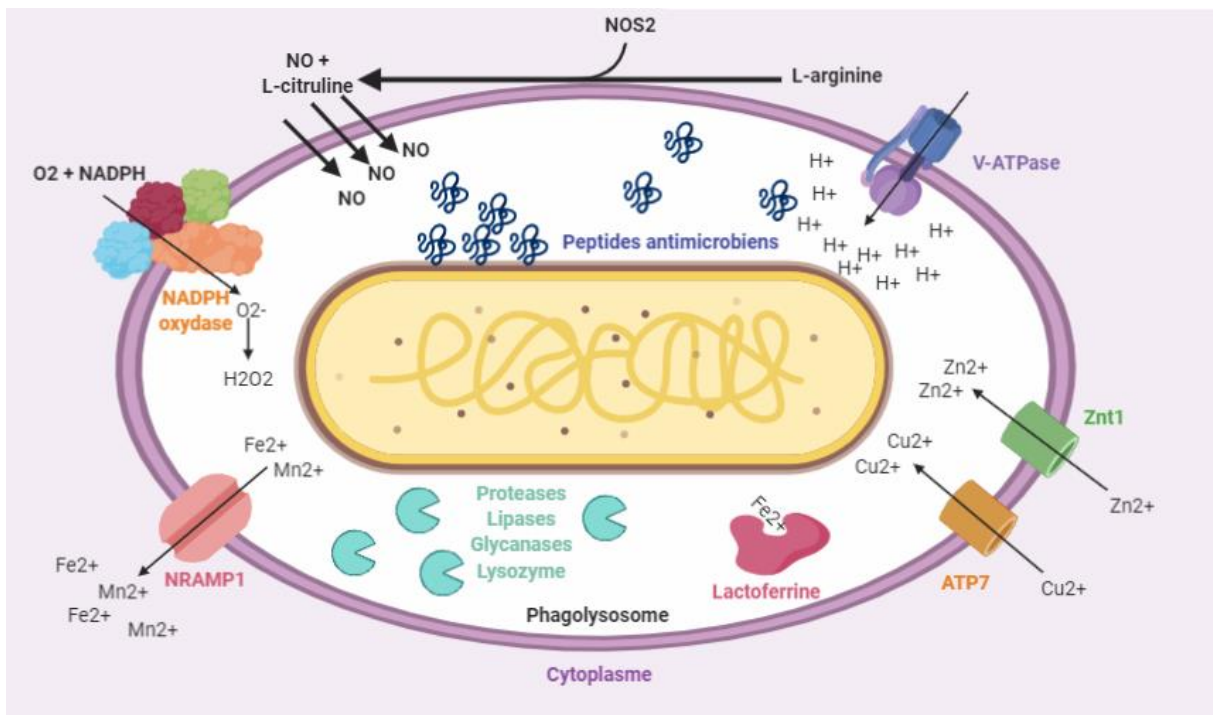


Figure 13 - Mécanismes de dégradation des bactéries dans les phagolysomes. Les nutriments sont éliminés de la lumière lysosomale *via* les pompes NRAMP1, le fer est capturé par les lactoferrines, l'acidification est effectuée par l'intermédiaire des pompes V-ATPase et de nombreuses enzymes et peptides antimicrobiens sont présents.

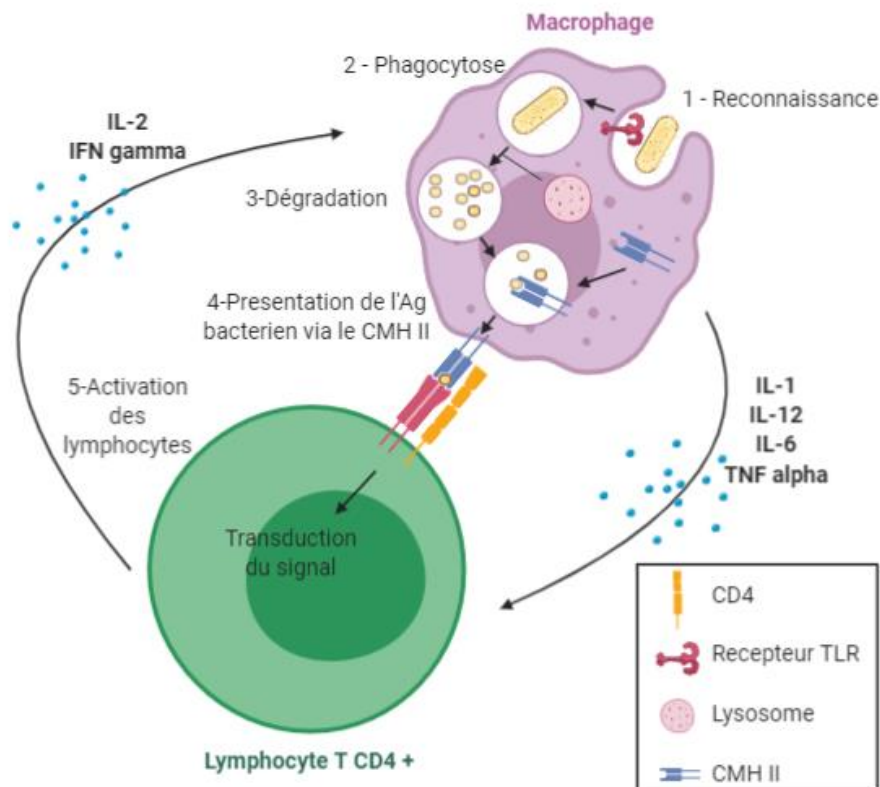


Figure 14 - Présentation d'Ag *via* le CMH-II- activation de l'immunité spécifique. La bactérie est reconnue (1) et internalisée par le macrophage (2) qui va la dégrader (3) et utiliser les antigènes associés pour les présenter aux cellules de l'immunité adaptatives spécialisée *via* le CMHII (4) entraînant leur activation et la production de cytokines pro inflammatoire(5)

vitesse de maturation semblent dépendre du type de reconnaissance par les cellules phagocytaires (de Chastellier et Thilo 1997).

-Présentation d'antigène (Ag): La reconnaissance de PAMPs telle que le lipopolysaccharides (LPS) par les macrophages et les cellules dendritiques induit une tubulation du lysosome associée au compartiment du complexe d'histocompatibilité de classe II (CMH II) pour aboutir à la présentation de l'Ag (**Figure 14**).

Cette reconnaissance *via* les récepteurs de la famille Toll (Toll like receptor, TLR) va enclencher le signal PI3K-AKT-mTor augmentant la concentration d'Arl8 à la surface des lysosomes. Le phagosome initial ayant phagocyté le pathogène va fusionner avec les lysosomes et être amarré *via* Arl8 au réseau de microtubules. Le phagolysosome mature finissant de détruire sa cible va glisser sur le microtubule jusqu'à la membrane de la cellule phagocytaire. Les Ag du pathogène détruit vont être conjugués à leur CMH II et exprimés à la surface. Ils seront reconnus par les Lymphocytes T *via* le CD4 (Hipolito, Ospina-Escobar, et Botelho 2018; Mrakovic et al. 2012, 7; Saric et al. 2016). La mobilité des phagosomes par l'intermédiaire de la tubulation semble faciliter leur fusion avec les lysosomes (**Figure 15**).

4- Autophagie :

L'autophagie partage comme caractéristique commune avec la phagocytose la fusion finale avec les lysosomes pour aboutir à la dégradation de l'élément ciblé. L'autophagie permet le maintien de l'homéostasie cellulaire en intervenant, contrairement à la phagocytose, dans la dégradation d'élément intra-cellulaire. Elle cible de manière non sélective des parties du cytoplasme ou de manière sélective des constituants intracytoplasmiques comme des organites qui sont endommagées ou des protéines non fonctionnelles *via* les lysosomes. Elle est déclenchée et permet une adaptation des cellules face à différents stress métaboliques (Choi, Ryter, et Levine 2013). Ce mécanisme est également impliqué dans la défense contre les bactéries intracellulaires. Les protéines nécessaires pour l'autophagie sont différentes de celles de la phagocytose et sont une trentaine de la famille des ATG.

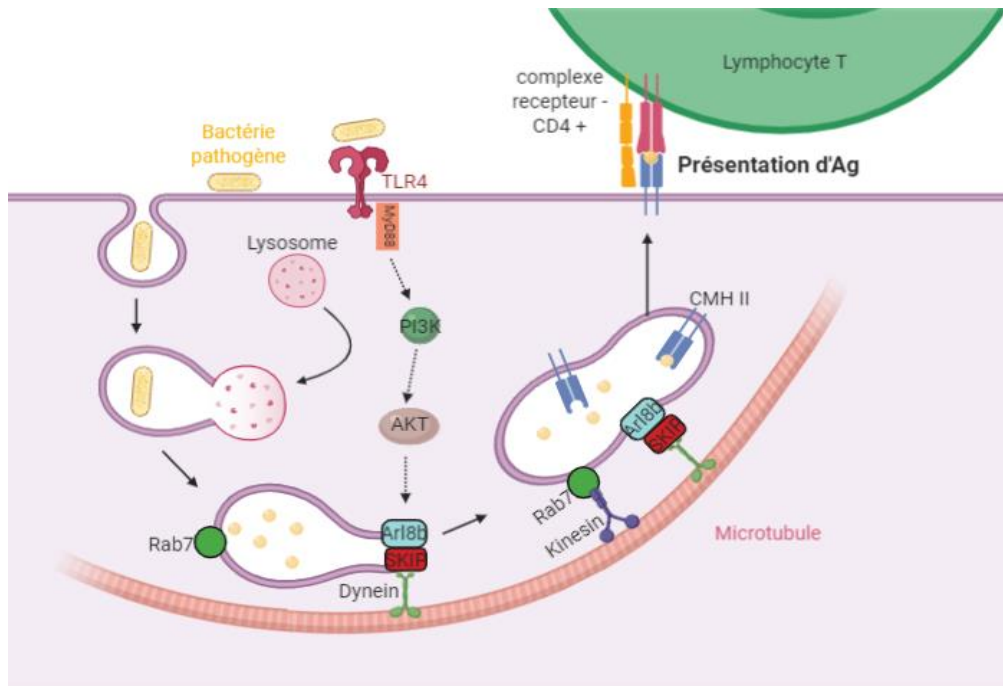


Figure 15- Amorçage de l'Ag bactérien sur le CMH-II et présentation à la surface via le réseau de microtubules. Les bactéries phagocytées sont dégradées par le macrophage, la vacuole de dégradation contenant les antigènes bactériens (cercles jaunes) est associée au réseau de microtubules par l'intermédiaire des dynéines et kinésines pour permettre la présentation de l'antigène aux lymphocytes par l'intermédiaire du CMH II. Figure adaptée de Bothelo lab.

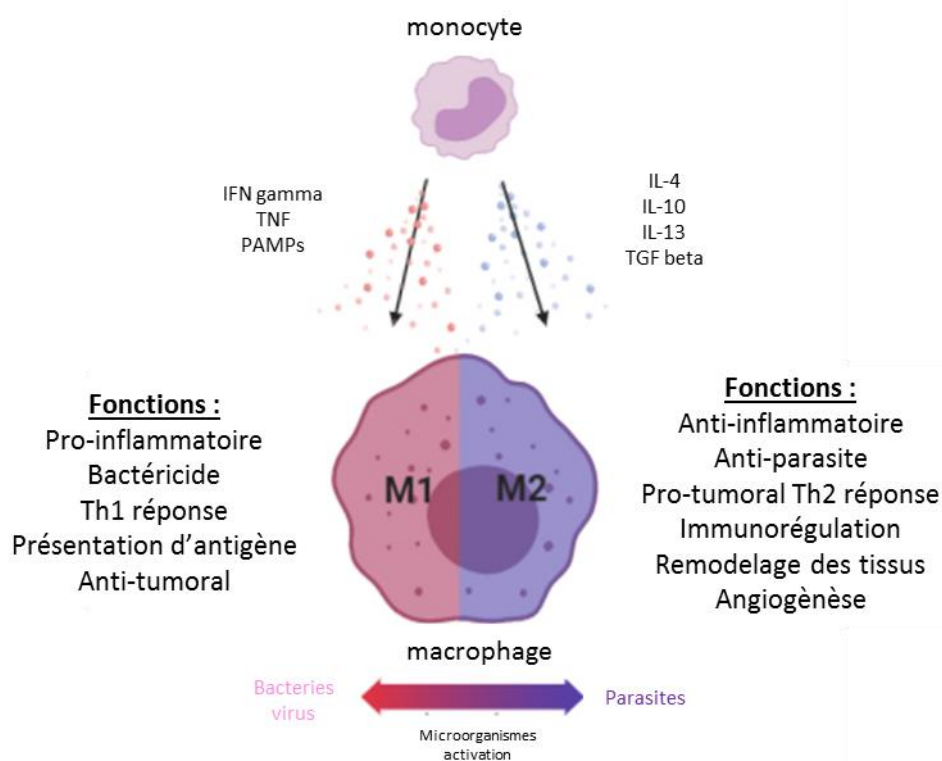


Figure 16- Polarisation des macrophages. La polarisation des macrophages dépend des *stimuli* rencontrés, les fonctions associées au stade M1 et M2 sont ensuite très différentes. Les macrophages M1 vont notamment inhiber la prolifération des cellules tumorales et détruire les bactéries, à l'inverse le stade M2 a une activité favorable à la dissémination tumorale, à la réparation des tissus et également une activité anti parasitaire. Les macrophages ainsi polarisés vont activer à leur tour la polarisation des cellules T en Th1 et Th2 respectivement.

5- Mort programmée :

Une autre manière de contrôler l'infection des macrophages est leur mort programmée. Lorsque les cellules sont infectées par un pathogène intracellulaire une option pour éliminer efficacement le foyer infectieux est la destruction de celui-ci. Il existe trois types de morts : l'apoptose, la nécrose et la pyroptose. La pyroptose est la voie principalement utilisée pour la défense contre les bactéries intracellulaires, elle permet d'enclencher une réaction inflammatoire associée. Son efficacité repose sur l'élimination du foyer infectieux en les expulsant de leur niche intracellulaire et la libération d'IL-1 induisant le recrutement de neutrophiles qui ont un haut pouvoir bactéricide (Bergsbaken, Fink, et Cookson 2009; Miao et al. 2010).

6- Polarisation :

Les macrophages en fonction des *stimuli* environnementaux vont s'activer et se spécialiser en fonction de la réponse à fournir (**Figure 16**). Pour cela, ils peuvent prendre deux stades M1 et M2 :

-M1 : activé par des produits microbiens comme le LPS ou des cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron- γ ou du TNF- α , ils secrètent des cytokines pro-inflammatoires inhibant la prolifération de cellules tumorales et luttent contre les bactéries et virus pathogènes.

-M2 : Plutôt activé par des *stimuli* exprimés en phase de guérison suite à une infection ou une blessure, ils comprennent, l'interleukine-4, 10, 13 (IL-4, IL10, IL-13) et le TGF- β (Saqib et al. 2018). Ils ont un rôle anti-inflammatoire et interviennent dans le remodelage et la réparation des tissus.

7- Systèmes de séquestration du fer : hypoferremia

Contre les infections bactériennes, l'hôte a mis en place une immunité nutritionnelle qui consiste en la rétention d'éléments nutritifs essentiels au développement des bactéries, le fer en fait partie. Le fer est indispensable pour l'activité de protéines ou de cofacteurs essentiels chez les bactéries. Le fer est un biocatalyseur, capable d'adopter deux valences stables, ferrique et ferreux, conférant un important potentiel d'oxydoréduction aux

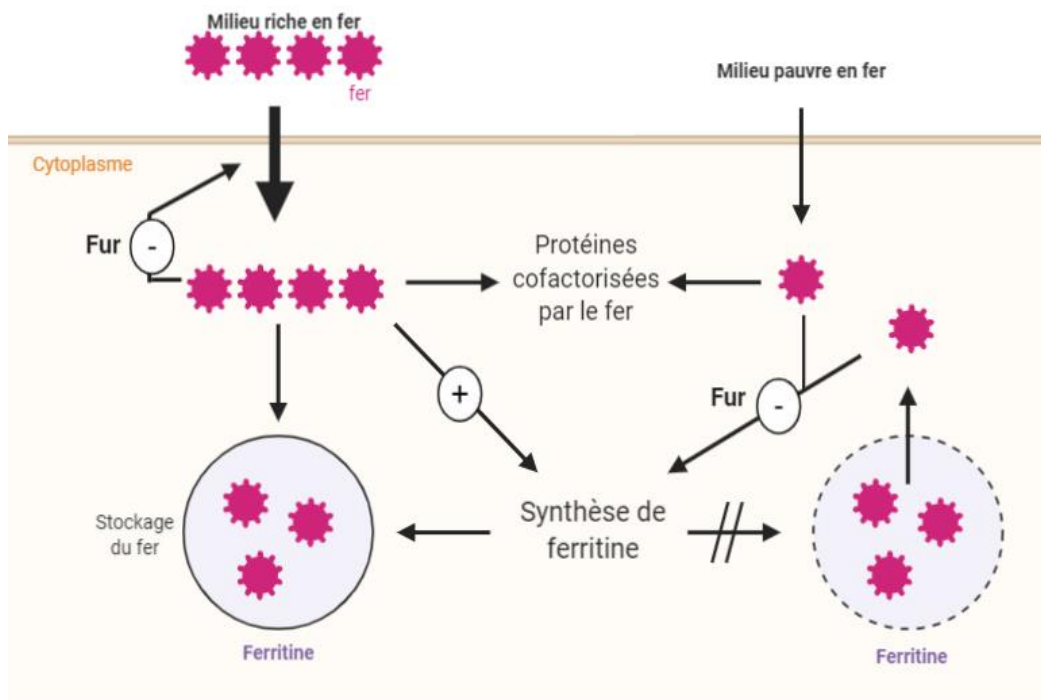


Figure 17 - Régulation du fer par Fur. Dans un milieu riche en fer, la concentration de fer ferreux dans le cytoplasme bactérien est contrôlée par Fur qui réprime l'absorption du fer. Le fer présent dans le cytoplasme est stocké dans les ferritines dont l'expression est stimulée et utilisée pour les protéines cofactorisées par le fer. Dans un milieu pauvre en fer, la synthèse des ferritines est réprimée et le fer stocké est relargué dans le cytoplasme. Figure adaptée de (Bereswill et al. 2000)

protéines contenant du fer. Lors d'une infection, le fer est difficile d'accès pour les bactéries en raison des mécanismes mis en place par l'hôte pour séquestrer le fer intracellulaire. Parmi eux, l'utilisation de ferritine, une protéine de stockage du fer et la rétention dans l'hème en tant que cofacteur de l'hémoglobine ou de la myoglobine. Les petites quantités de fer extracellulaire sont étroitement liées aux protéines porteuses telles que la transferrine, la lactoferrine et l'hémopexine (Crichton et Charlotiaux-Wauters 1987). De plus, l'environnement aérobie du sérum et son pH neutre font en sorte que le fer extracellulaire reste insoluble, la combinaison de ces facteurs rend l'accès au fer particulièrement difficile pour les pathogènes intracellulaires ce qui limite leur multiplication (Skaar 2010).

La détection du fer par les entérobactéries implique le régulateur Fur (régulateur de l'absorption ferrique). Le régulateur Fur est associé au Fe^{2+} lorsque le niveau intracellulaire de fer est élevé, le complexe Fur- Fe^{2+} se lie sur le promoteur de certains gènes impliqués dans l'utilisation et l'acquisition de fer pour réprimer leur expression (Troxell et Hassan 2013; McHugh et al. 2003) (Massé et al. 2007) (**Figure 17**). Le fer est une nécessité absolue pour la cellule, mais en excès, il peut être toxique. Si le fer n'est pas lié à une protéine ou chélaté, il peut servir de catalyseur dans la réaction de Haber-Weiss dans laquelle des radicaux hydroxyles hautement réactifs sont générés à partir de peroxyde. Un environnement riche en oxygène peut entraîner une réduction incomplète de l' O_2 et peut induire la formation de superoxyde. Le superoxyde peut convertir le fer ferrique en fer ferreux et dans la réaction de Fenton, le Fe^{2+} réagit avec le peroxyde pour produire des radicaux hydroxyles et oxyder le fer. La production de ces radicaux peut avoir des effets délétères sur les cellules en provoquant des dommages à l'ADN pouvant entraîner une augmentation des mutations spontanées, et en endommageant les lipides et les protéines non saturées. La régulation par Fur permet d'apporter les quantités de fer suffisantes à la bactérie pour son métabolisme et sa multiplication en limitant la toxicité liée à la production d'espèces réactives de l'oxygène (Carpenter et Payne 2014).

Afin d'exploiter les ressources en fer de l'hôte, les pathogènes possèdent fréquemment des systèmes de capture et de solubilisation du fer, appelés sidérophores ou systèmes d'acquisition de l'hème (hémophore), ils entrent en compétition avec la séquestration du fer médiée par l'hôte (Miethke et Marahiel 2007). Certains de ces systèmes font partie du génome cœur de chaque espèce. Les sidérophores sont des composés de faible poids

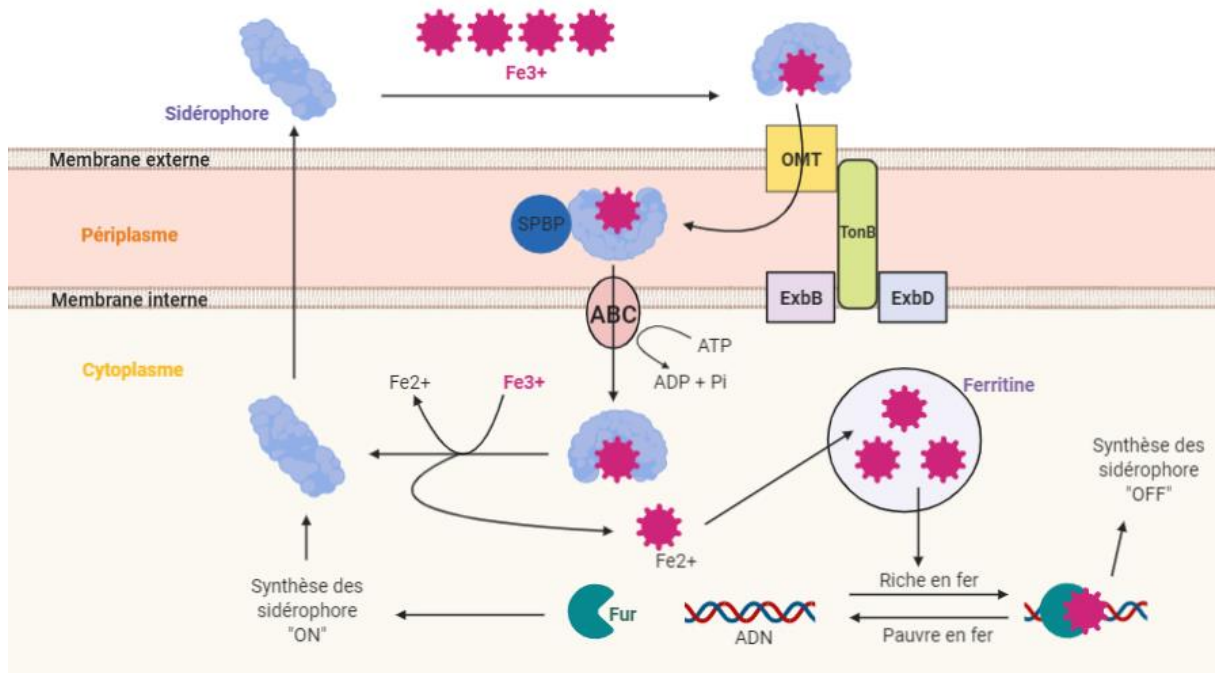


Figure 18 - Absorption du fer par les sidérophores chez les bactéries Gram négative. Lorsque le fer est en abondance, le régulateur Fur combiné au fer présent dans le cytoplasme se fixe à l'ADN pour réprimer la synthèse des sidérophores. Lorsque le milieu est pauvre en fer, Fur ne réprime plus les gènes nécessaires à la synthèse des sidérophores qui sont produits dans le cytoplasme et relâchés dans le milieu extracellulaire. Les sidérophores chélate le Fe³⁺ pour former un complexe soluble. Le complexe sidérophore-Fer est transporté dans le périplasme *via* une protéine de transport de haute affinité de la membrane externe (OMT). Ce transport est permis par la force motrice des protons avec un transfert d'énergie induit par le complexe TonB/ExbB/D. Le complexe est ensuite lié par une protéine de liaison périplasmique-sidérophore (SPBP) et est acheminé vers un transporteur (ABC) dépendant de l'ATP permettant le passage dans le cytoplasme. Le fer est ensuite retiré du sidérophore par réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺ par une enzyme réductase et sera stocké ou utilisé. Le sidérophore est ensuite recyclé. Figure adaptée de (Wencewicz et al. 2013)

moléculaire avec une très grande affinité pour le fer. Ils sont sécrétés par les bactéries lorsque les disponibilités en fer sont limitées, les complexes sidérophore-fer (halosidérophores) formés seront ensuite reconnus par des récepteurs à la surface des bactéries pour être transportés dans leur cytoplasme (**Figure 18**). Les sidérophores peuvent eux-mêmes être classés en trois familles en fonction de leur structure : carboxylate, catécholate et hydroxamate (Holden et Bachman 2015; Miethke et Marahiel 2007). Un des sidérophore présent chez les enterobactéries est appelé enterobactine. Chez *E. coli* les gènes nécessaires à sa biosynthèse et son transport sont *entD-fepA-fes-entD-fepE-fepC-fepG-fepD-fepB-entC-entE-entB-entA-yABA*. L'entérobactine est synthétisée par les enzymes codées par les gènes *entA, B, C, D, E et F* à partir du chorismate (Crosa et Walsh 2002). L'apo-enterobactine peut être sécrétée directement de son site de synthèse à travers l'enveloppe par l'intermédiaire d'une pompe associée à la membrane. Le gène *fepA* code pour le récepteur protéique de la membrane externe et les gènes *fepB, fepC, fepD, fepE* et *fepG* interviennent dans l'absorption de l'enterobactine ferrique dans le cytoplasme (Crosa et Walsh 2002). D'autres sidérophores existent, comme la yersiniabactine, identifiée pour la première fois chez *Yersinia enterocolitica*, mais présente également chez *E. coli*. La yersiniabactine possède à la fois des groupes carboxylate et hydroxamate (**Figure 20**). Les carboxylates ont une plus grande affinité pour le fer dans des conditions où le pH est acide. Les hémophores sont des protéines uniquement retrouvées chez les bactéries Gram négatives. Elles permettent l'acquisition de l'hème associée à l'hémoglobine agissant ensuite de la même façon que les sidérophores en se fixant à des récepteurs extracellulaires de la bactérie pour permettre le transport intracellulaire (Hantke 1981; Wandersman et Delepelaire 2004).

8- Subversion des macrophages par les bactéries pathogènes

Pour permettre par la suite une mise en perspective de mon modèle d'étude, je vais dans cette partie commencer par parler des macrophages comme niche répliquative puis détailler les principaux mécanismes employés par certains pathogènes pour détourner leurs défenses. Les défenses immunitaires se battent continuellement contre des

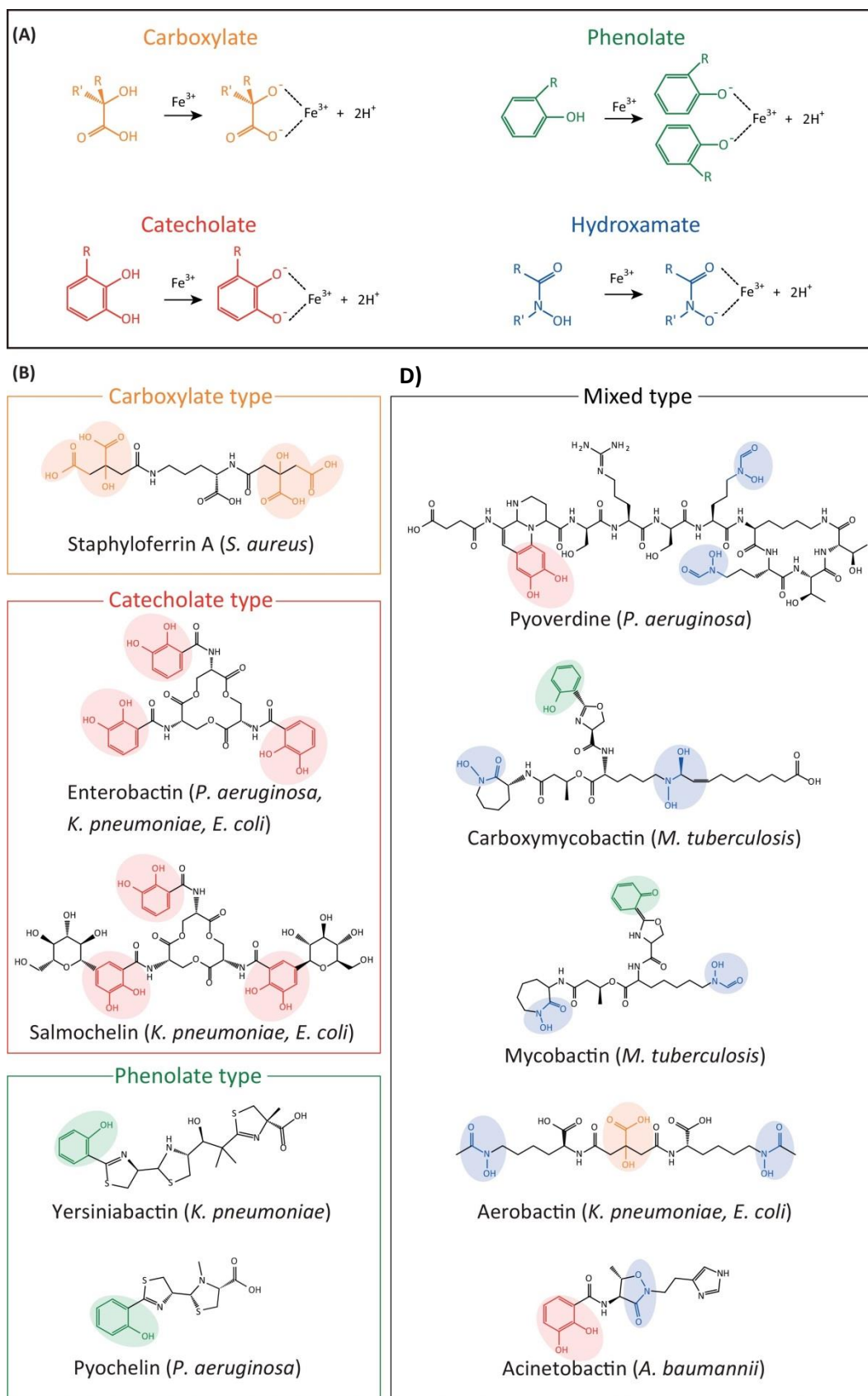


Figure 19 - Structure des sidérophores. A. Les sidérophores peuvent être classés en fonction de groupement de liaison au fer: catécholate (orange), phénolate (vert), carboxylate (rouge), hydroxamate (bleu). B. Structure de sidérophores de pathogènes nosocomiaux. C. Structure de sidérophores de type mixte contenant plus d'un groupe de liaison au fer (Wilson et al. 2016).

pathogènes rencontrés dans l'environnement. Grâce à la sélection de mutations et le transfert de gènes entre espèces les bactéries évoluent et acquièrent de nouveaux systèmes défensifs et offensifs qui permettent la survie, l'adaptation ou la colonisation d'une nouvelle niche et cela malgré la puissance des mécanismes d'immunité innée et adaptative.

8-1 Le paradoxe des macrophages : première ligne de défense et niche privilégiée

Les macrophages disposent d'un arsenal de reconnaissances et de mécanismes nécessaires à la destruction des bactéries. Néanmoins de nombreuses bactéries pathogènes les choisissent comme niche répliquative. Ce paradoxe s'explique par l'apparente nécessité pour la plupart des bactéries pathogènes de résister au moins temporairement aux macrophages présents en abondance dans la *lamina propria* du tractus intestinal. Une fois acquise et sélectionnée, une stratégie de survie temporaire peut facilement évoluer vers une stratégie de colonisation et la création d'une niche.

Les macrophages sont des cellules circulantes, les pathogènes peuvent donc sélectionner cette niche pour favoriser une propagation systémique chez l'hôte. Parmi les cellules circulantes, les macrophages semblent constituer une niche plus favorable que les neutrophiles, plus agressifs. Les macrophages modifient leur métabolisme en fonction des différents sites de l'hôte, les pathogènes pourraient ainsi en tirer avantage pour leur propre réplication. En cas d'infection par des bactéries, les macrophages se polarisent préférentiellement en stade M1. Pour permettre la production de macromolécules et permettre la réponse immunitaire et inflammatoire associée à cette polarisation, les macrophages ont besoin d'augmenter extensivement leur métabolisme du carbone (Ganeshan et Chawla 2014). Ce changement métabolique pourrait être exploité par les pathogènes. Les macrophages M2, préférentiellement en contact avec les parasites, se trouvent en forte difficulté pour l'élimination des bactéries. Certaines bactéries peuvent en tirer avantage et forcer cette polarisation pour faciliter leur propre réplication, c'est le cas par exemple pour *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* et *Francisella Tularensis* (Rajaram et al. 2010; Abdullah et al. 2012; Shirey et al. 2008). Dans le cas de *Salmonella enterica* et *Brucella abortus*, ces bactéries se répliquent préférentiellement dans

les macrophages M2 les utilisant comme niche pour la persistance. La persistance est un phénomène adaptatif favorisant les infections chroniques et qui sera détaillé plus loin dans cette introduction. *Salmonella* après une infection initiale des macrophages M1, s'associe à des stades plus avancés de l'infection préférentiellement aux M2 pour constituer une niche sur le long terme. Elle profite de la déficience des M2 pour le facteur de transcription (PPAR δ) nécessaire au métabolisme des acides gras. L'activation de ce facteur de transcription par *Salmonella* favorise son état répliatif (phénotype unique à cette bactérie suggérant une spécificité métabolique de salmonella) et induit également l'état de persistance (Eisele et al. 2013; Stapels et al. 2018). La manipulation du programme métabolique de l'hôte peut donc également être utilisée pour la persistance des pathogènes (voir chapitre sur la persistance).

Une dernière hypothèse concernant l'infection préférentielle des macrophages de l'hôte humain par les bactéries pathogènes est proposée à partir de la très forte ressemblance mécanistique avec les infections avec les amibes, qui est un hôte très courants de la plupart des espèces pathogènes de l'homme (Greub et Raoult 2004). L'adaptation des bactéries pathogènes peuvent avoir comme origine leurs rencontres fréquentes avec les amibes leur permettant en conséquence un parasitisme efficace des macrophages humains (Molmeret et al. 2005).

8-2 Mécanismes de détournement des macrophages par les bactéries pathogènes

La colonisation bactérienne des macrophages a été observée dans le cytosol, dans des vacuoles issues de la phagocytose ou de l'autophagie, ou encore associée au réticulum endoplasmique comme c'est le cas pour *Brucella*. Le cytosol représente une niche répliative plus favorable que les compartiments phagocytaires. Il permet d'échapper aux stress présents dans les vacuoles et présente un environnement riche en nutriments, mais en contrepartie, les bactéries seront ciblées par l'autophagie sélective et risquent de déclencher la mort cellulaire de leur hôte (Price et Vance 2014). La colonisation vacuolaire, quant à elles, constitue un camouflage idéal contre les défenses immunitaires. La colonisation de ces compartiments fait souvent intervenir un détournement du réseau vacuolaire ou une

détoxification de l'environnement pour permettre la colonisation de la cellule de l'hôte par le pathogène.

8-2-1 Sécrétion d'effecteurs:

Les bactéries pathogènes sécrètent fréquemment des effecteurs pour permettre la manipulation à son bénéfice de l'hôte infecté. Cette étape va permettre de moduler certaines fonctions de l'hôte comme sa capacité à enclencher une réponse immunitaire, le routage des vacuoles intracellulaire ou la sécrétion de toxines. Pour qu'ils puissent avoir une action alors que le pathogène est enfermé dans la vacuole de phagocytose du macrophage, les effecteurs doivent être sécrétés dans cette vacuole et éventuellement diffusés ou être exportés vers le cytosol ou le noyau (Rapisarda et Fronzes 2018). La sécrétion à l'extérieur de la bactérie s'effectue par l'intermédiaire d'appareils de sécrétion. Il existe à ce jour plusieurs systèmes de sécrétion décrits dans la littérature permettant d'établir une niche répliquative pour les pathogènes utilisant la nomenclature TXSS (système de sécrétion de type X) (Rao et al. 2004; Suarez et al. 2008; de Bruin, Ludu, et Nano 2007). Je vais décrire plus précisément : les appareils de sécrétion de type 3 (T3SS), de type 4 (T4SS) et de type 6 (T6SS) tous trois présents chez les bactéries entérobactéries pathogènes (**Tableau 2**).

8-2-1-1 Les appareils de sécrétion de type 3

Les appareils de sécrétion de type 3 ont été observés pour la première fois dans les années 90 chez *Yersinia* (Michiels et al. 1990). C'est un facteur de virulence très conservé présent chez de nombreux pathogènes tels qu'*Escherichia coli entéropathogène* (EPEC), *Escherichia coli entérohémorragique* (EHEC), *Salmonella sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* et *Chlamydia sp* (Schroeder et Hilbi 2008; Wong et al. 2011; Dean 2011; Agbor et McCormick 2011). Le contact avec une membrane cellulaire eucaryote déclenche la libération de protéines effectrices dans le cytosol de la cellule eucaryote infectée. Les bactéries pathogènes ont la possibilité d'en libérer plusieurs types durant une injection (Cornelis 2006). Ils peuvent avoir pour rôle d'inhiber la phagocytose, réguler négativement la réponse pro-inflammatoire, éviter l'autophagie, induire la mort cellulaire, réguler la chromatine ou modifier le trafic vacuolaire. Les T3SS sont codés par un îlot de gènes acquis

Nom	Pathologie	Autres niches	Niche intracellulaire	Système de sécretion
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	anaplasmose	Granulocytes, cellules endothéliales	vacuole	T4SS
<i>Bartonella henselae</i>	bartonellose	cellules endothéliales, erythrocytes	vacuole	T4SS
<i>Brucella abortus, melitensis</i>	brucellose	trophoblastes	vacuole	T4SS
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	melioïdose	neutrophiles	cytosol	T3SS; T6SS
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	pneumonie		vacuole	T3SS
<i>Chlamydia trachomatis</i>	infections sexuellement transmissibles, pneumopathies	Cellules épithéliales	vacuole	T3SS
<i>Coxiella burnetii</i>	fièvre Q		phagolysosome	T4SS
<i>Edwardsiella tarda</i>	gastroenterite	Cellules épithéliales	dérivé de phagosome	T3SS; T6SS
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	ehrlichiose		early endosome	T4SS
<i>Francisella tularensis</i>	tularemie	Cellules épithéliales	cytosol	T6-like SS (FPI)
<i>Legionella pneumophila</i>	légionellose	protozoaire	vacuole	T4SS
<i>Listeria monocytogenes</i>	gastroenterite	Cellules dendritiques	cytosol	Listeriolysin O, ActA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	tuberculose		vacuole	T7SS (ESX)
<i>Rickettsiae</i>	fièvre Q, typhus	Endothélium vasculaire	cytosol	various
<i>Salmonella enterica</i>	fièvre typhoïde gastroenterite	Cellules dendritiques et épithéliales	late endosome	T3SS
<i>Shigella flexneri</i>	diarrhée	Cellules épithéliales	cytosol	T3SS

Tableau 2 - Macrophage comme niche privilégiée de certaines bactéries intracellulaires

par transfert horizontal et peuvent être subdivisés en 7 familles (*Chlamydiales*, Hrp1, Hrp2, SPI-1, SPI-2, Rhizobium et Ysc) toutes significativement assez éloignées les unes des autres. Certaines bactéries pathogènes peuvent coder pour plusieurs T3SS appartenant à des familles différentes comme c'est le cas pour *Salmonella typhimurium* qui porte deux îlots de pathogénicité SPI-1 et SPI-2 chacun codant pour un T3SS (Waterman et Holden 2003). Les T3SS sont composés d'un corps basal identique à celui du flagelle composé de deux paires d'anneaux qui s'enchaînent au niveau des membranes bactériennes. Selon la famille d'injecteur vient s'ajouter à ce corps basal, une aiguille, un filament ou un pilus (Tamano et al. 2000; Journet et al. 2003) (**Figure 20**).

8-2-1-2 Les appareils de sécrétion de type 4

L'appareil de sécrétion de type IV permet la sécrétion d'une large gamme de substrat par un grand nombre de bactéries Gram négatives. Il permet notamment la sécrétion d'ADN permettant la dissémination de gènes d'antibiorésistance, de plasmides conjugatifs ou de toxines (Grohmann et al. 2018). Il permet également la sécrétion de substrat protéique ou d'ADN chez les cellules cibles eucaryotes, c'est le cas pour *Burkholderia cenocepacia*, *Xanthomonas axonopodis* et *Campylobacter jejuni* (Christie et Cascales 2005; Engledow et al. 2004; Alegria et al. 2005; Batchelor et al. 2004). Le type IV d'*Ehrlichia chaffeensis* notamment permet la translocation dans le cytoplasme des macrophages d'effecteurs ciblant les mitochondries et la limitation de la production de ROS et l'apoptose de celui-ci (H. Liu et al. 2012) (**Figure 20**).

8-2-1-3 Les appareils de sécrétion de type 6

Les appareils de sécrétion de type 6 (T6SS) sont des armes polyvalentes à la fois contre les cellules eucaryotes et les bactéries concurrentes. En général les T6SS sont soit antibactériens soit anti-eucaryotes offrant un avantage sélectif pour la colonisation de niche spécifique (Pukatzki et al. 2007). Ils sont largement répandus chez les bactéries Gram négatives qui peuvent en contenir plusieurs à la fois (Coulthurst 2013). Par exemple *B. thailandensis* en possède cinq. Les T6SS sont encodés par un groupe de gènes annotés comme IAHP ((IcmF Associated Homologous Proteins). L'acquisition de ces systèmes de sécrétion s'est faite

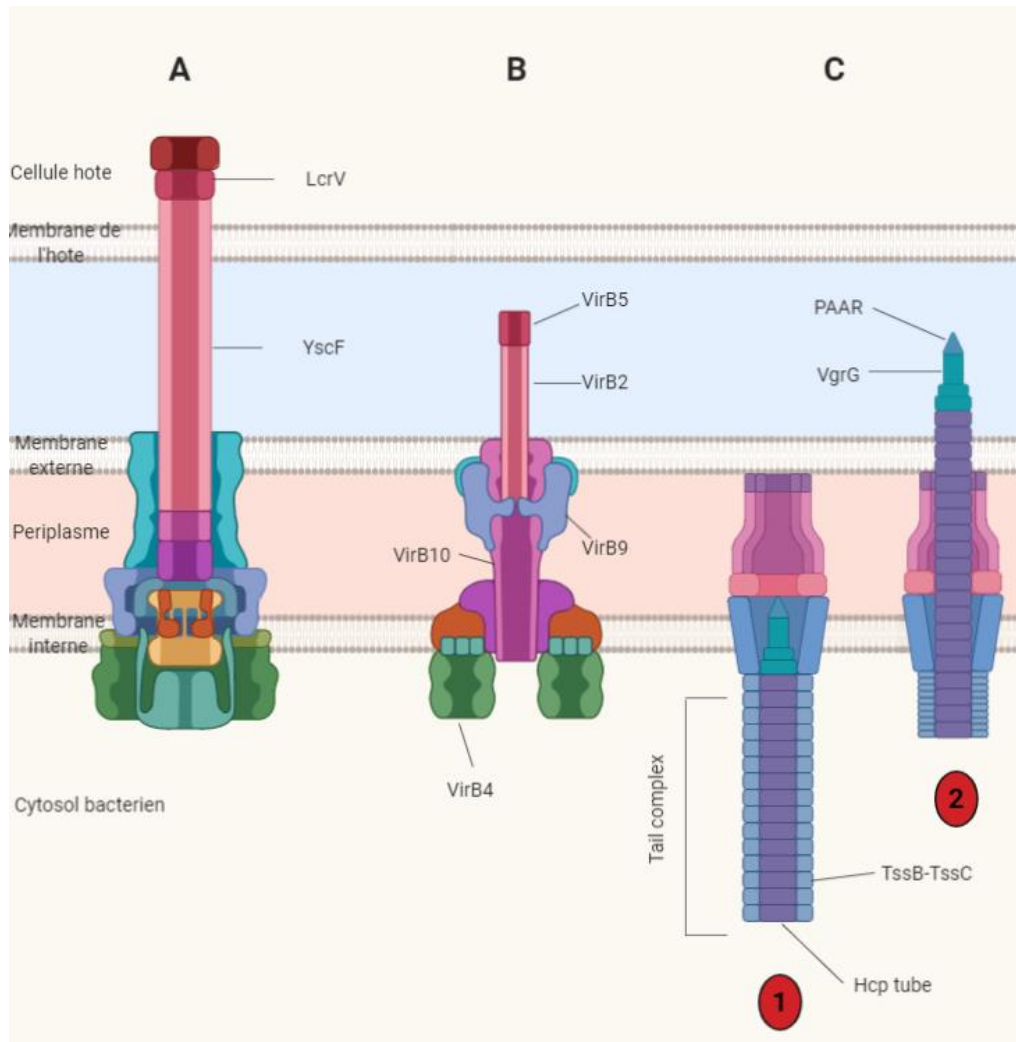


Figure 20 : Systèmes de sécrétion. A) T3SS B) T4SS C) T6SS 1- Le complexe est chargé et prêt à la contraction 2- La contraction de la gaine permet l'éjection du complexe formant l'aiguille.

grâce à un transfert horizontal de gènes puis une adaptation évolutive en fonction des différentes niches rencontrées par les bactéries qui les possèdent (Boyer et al. 2009). L'aiguille des T6SS est composée d'anneaux hexamériques Hcp formant le tube interne et des protéines VgrG et PAAR formant le sommet de l'aiguille. L'aiguille est entourée par des anneaux formés par les protéines TssB et TssC formant une gaine. Les protéines TssK, TssF, TssG, TssE, forment la base située dans l'enveloppe bactérienne. Les protéines de membrane interne TssL, TssM et TssJ interagissent avec les protéines de la base. La contraction de la gaine TssB-TssC propulse le pic VgrG-PAAR (Y.-J. Park et al. 2018). Les composants extracellulaires de l'aiguille du T6SS sont similaires à ceux de la queue du bactériophage λ (**Figure 20**). Cette machinerie est dépendante du contact bactérie-cellule ou bactérie-bactérie. Pour la plupart des systèmes connus, l'identification des effecteurs sécrétés reste encore à l'état d'exploration.

Il a été montré dans de nombreux cas que l'altération du T6SS affecte la virulence de bactéries pathogènes. Les rôles des T6SS chez les pathogènes sont divers, ils permettent l'invasion des cellules hôtes, la modification des macrophages, la réponse aux stress et la formation de biofilm (Cascales 2008). L'implication des T6SS dans la colonisation des macrophages a été mise en évidence chez *L. pneumophila* pour qui la sécrétion de la protéine IcmF permet la réplication dans le macrophage par inhibition de la fusion phagosome-lysosome et induction de l'apoptose (Purcell et Shuman 1998). Chez *F. tularensis* un T6SS est impliqué dans la modification du phagosome et la libération de la bactérie dans le cytosol (de Bruin, Ludu, et Nano 2007; Barker et Klose 2007). Un autre des rôles des T6SS est la réponse et l'adaptation aux stress environnementaux, mis en évidence chez *V. anguillarum* pour qui le T6SS module le quorum sensing (B. Weber et al. 2009). Un dernier phénotype associé au T6SS est l'implication dans la formation de biofilm. Chez les *Escherichia coli* pathogènes aviaires (APEC), une délétion du T6SS a montré une altération de la capacité à former des biofilms et une diminution de la pathogénicité chez les poussins (de Pace et al. 2011). L'implication du T6SS dans le phénotype de biofilm a également été observée chez *Vibrio parahaemolyticus* et *P. aeruginosa* (Enos-Berlage et al. 2005; Southey-Pillig, Davies, et Sauer 2005). Le génome de LF82 code pour deux T6SS complets dont le rôle dans l'infection est encore inconnu et un T6SS partiel que j'ai identifié lors de ma thèse et qui lui contribue sensiblement à la survie de LF82 dans les macrophages (voir résultats complémentaires Partie 10).

8-2-2 Détournement de la voie phagolysosomale

Les bactéries intracellulaires ont développé différentes stratégies pour éviter la rencontre avec les composants microbicides présents dans les macrophages. Ces stratégies de détournements incluent l'interférence de la maturation des phagosomes qui peuvent être bloquées à différents moments du cycle, la résistance au stress internes des phagolysosomes et même l'évasion physique du phagosome.

L'acidification de la vacuole par l'intermédiaire des pompes V-ATPases est l'un des événements les plus importants du processus de maturation du phagolysosome. L'acidification de ce compartiment permet le ralentissement du métabolisme des bactéries et également le bon fonctionnement de nombreuses enzymes hydrolytiques ainsi que de l'activation de la NADPH oxydase. La plupart des pathogènes intracellulaires bloquent la maturation du phagosome initial. Pour cela ils vont manipuler la cellule hôte en modifiant le trafic vésiculaire à leur bénéfice en empêchant la fusion avec les lysosomes (M. M. Weber et Faris 2018). Les pathogènes ont besoin, pour créer une niche répliquative adéquate, de nutriments nécessaires à leur multiplication. Une des défenses mises en place par le macrophage est donc la privation de cet apport nutritif par l'intermédiaire de pompes ou de chélateur comme c'est le cas pour le fer (Appelberg 2006). Par ailleurs le pH acide permet aux transporteurs de fonctionner correctement, et ceci dépend donc de la fusion avec les lysosomes (Flannagan, Cosío, et Grinstein 2009). En bloquant la fusion avec le trafic classique de phagocytose, certaines bactéries tel que *Legionella*, empêchent la plupart de ces pompes de fonctionner. Pour soutenir leur multiplication, les bactéries pathogènes détournent pour la plupart le trafic vésiculaire de leur hôte pour utiliser ses ressources nutritives. Finalement, en cas d'infection intracellulaire, chaque pathogène génère une niche répliquative qui va lui être spécifique (Mitchell, Chen, et Portnoy 2016). Je vais détailler quelques-unes de ces stratégies à travers les exemples de bactéries intracellulaires : *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Chlamydia pneumoniae* et *Legionella pneumophila*/ *Brucella abortus*:

8-2-2-1 Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes est une bactérie Gram positif responsable de la listériose. Elle peut se diviser dans différents types de cellules hôtes au cours de l'infection et lors de l'infection des macrophages, elle est capable de coloniser plusieurs niches. Après l'internalisation, *Listeria monocytogenes* empêche la fusion des lysosomes avec le phagosome. Les vacuoles contenant *Listeria* ne recrutent pas la protéine Rab5 (endosome tardif) perturbant ainsi la maturation du phagosome et réduisant la fréquence de fusion avec les lysosomes (Henry et al. 2006) (**Figure 21**). La vacuole contenant *Listeria* est acidifié ce qui permet à la Listeriolysine O (LLO), une cytolysine produite par la bactérie, et à deux phospholipases C (PI-PLC et PC-PLC) de former des trous dans la membrane de ce compartiment. L'activité de LLO est optimale à pH 5,0, ce pH correspondant à celui retrouvé dans les endosomes tardifs. À un pH neutre, la cytolysine est inactive, son activité n'est donc effective que dans les vacuoles de phagocytose et pas dans le cytosol, empêchant la lyse de la cellule pendant la multiplication de la bactérie dans son cytoplasme (Henry et al. 2006). *Listeria* utilise les nutriments présents dans le cytosol pour se répliquer, son temps de génération est d'environ 30min dans ce contexte (Eylert et al. 2008). La bactérie induit la polymérisation de l'actine de la cellule hôte par l'intermédiaire de la protéine ActA, ce recrutement engendre la formation de queue d'actine à la surface bactérienne propulsant les bactéries à travers le cytoplasme vers les cellules voisines ce qui provoque une nouvelle infection permettant une dissémination rapide et efficace (Cossart et Lecuit 1998).

8-2-2-2 *Salmonella enterica*

Comme pour *Listeria*, la vacuole contenant *Salmonella Typhimurium* présente les caractéristiques des endosomes tardifs (**Figure 21**). Dans ce cas également, la maturation est bloquée pour éviter l'acquisition d'enzymes hydrolytique bactéricides contenus dans les lysosomes (Liss et al., 2017), l'acidification fait aussi pour cette bactérie, l'effet d'un signal d'alarme pour le déclenchement de la sécrétion de facteurs de virulences via le T3SS codé par l'îlot de pathogénicité SPI-2 (Kenney 2019). Après 4h d'invasion, la bactérie induit activement un remodelage de la vacuole dans laquelle elle se trouve en détournant le trafic de vésicules de la cellule hôte pour permettre la formation d'un compartiment multi tubulaire. Ces vésicules sont de toutes provenances, intracellulaires, mitochondriales, ribosomales, réticulum endoplasmique, nucléaire et Golgi (Vorwerk et al.

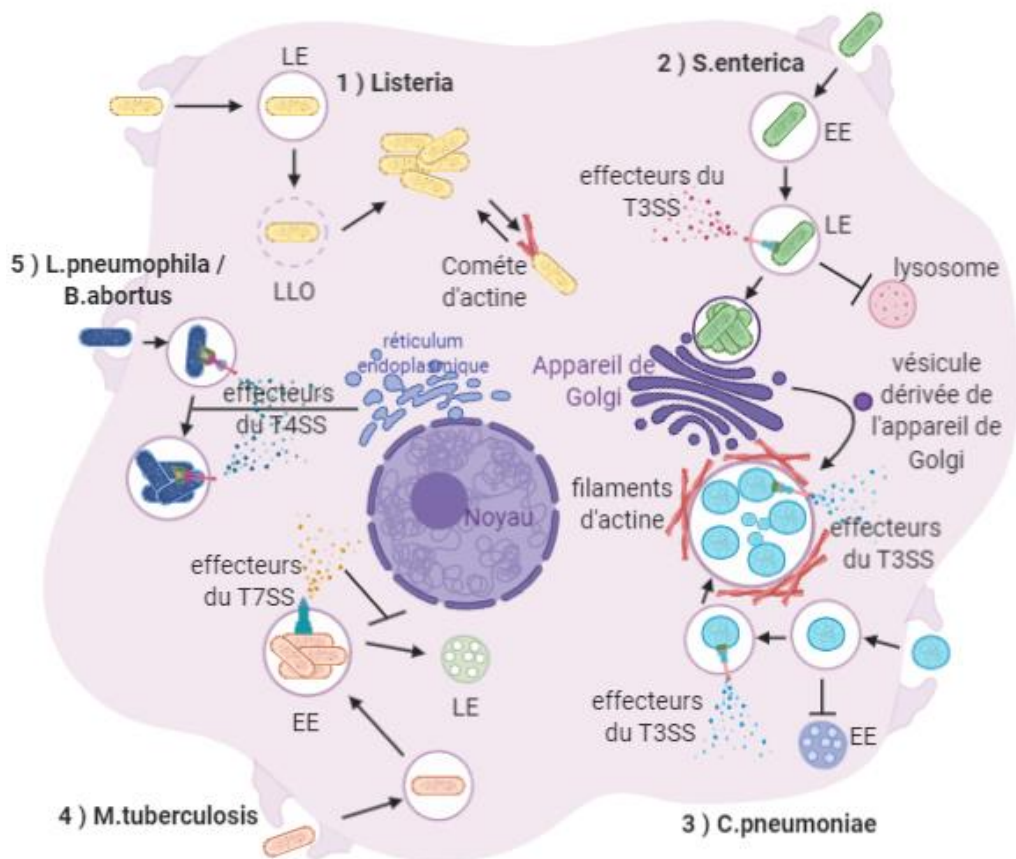


Figure 21 - Infection des macrophages par les bactéries pathogènes intracellulaires. 1-*Listeria* évite la fusion du phagosome d'entrée avec les lysosomes et s'échappe en produisant la toxine LLO pour se multiplier dans le cytoplasme et se déplacer par polymérisation d'actine. 2- *Salmonella enterica* empêche la fusion avec le lysosome, elle sécrète des facteurs de virulence par l'intermédiaire du T3SS activé en réponse au stress acide. Elle détourne ensuite le trafic vésiculaire formant des vacuoles multitubulaires provenant de la fusion de divers organites de la cellule hôte. 3- *Chlamydia pneumoniae* bloque la fusion avec les endosomes précoces (EE), sécrète des facteurs de virulence par l'intermédiaire de son T3SS et crée une large vacuole de réplication consolidée par la présence de filaments d'actine et la fusion de vésicules de diverses provenances. 4- La vacuole contenant *Mycobacterium tuberculosis* maintient la rétention de la GTPase Rab5 et l'exclusion de Rab7 elle évite ainsi la fusion avec les lysosomes, mais continue d'interagir sélectivement avec les endosomes précoces. L'acidité de la vacuole est contrôlée par exclusion des pompes V-ATPases, le pH est stabilisé autour de 6,5 maintenant la viabilité de la bactérie. 5- *Legionella pneumophila* et *Brucella abortus* modifient le trafic vésiculaire en sécrétant des effecteurs via leur T4SS et interceptent les vésicules provenant du réticulum endoplasmique .

2015). Les vacuoles formées sont appelées SIF (Salmonella Induced Filaments), elles possèdent des marqueurs endosomaux tels que LAMP1, Rab7 et des V-ATPase (Brumell et al. 2001; Drecktrah et al. 2007), mais pas d'enzymes hydrolytiques. Les SIF s'étendent sur toute la surface de la cellule augmentant la surface d'échange avec le cytosol. Il est envisagé que ce processus permettrait une disponibilité d'éléments nutritifs normalement limités au sein des vacuoles de phagocytoses et nécessaires pour la multiplication de *Salmonella*. Ces vacuoles migrent à proximité des appareils de Golgi probablement pour faciliter la fusion des vésicules en leur provenance (Salcedo and Holden, 2003).

8-2-2-3 Chlamydia pneumoniae

Chlamydia détourne la voie phagocytaire et se multiplie dans une vacuole non acide ne fusionnant jamais avec les endosomes tardifs et les lysosomes, mais intégrant des vésicules provenant de l'appareil de Golgi (**Figure 21**). Ce processus est très rapide après l'entrée dans la cellule. *Chlamydia* a un cycle d'infection unique, elle peut prendre deux morphologies différentes en fonction de la temporalité de l'infection ; le corps élémentaire (EB) et le corps réticulé (ER). Le cycle commence avec la forme EB puis se produit une réorganisation pour passer à la forme RE puis une inclusion mature contenant les deux formes. Ces inclusions matures peuvent contenir jusqu'à 1000 bactéries sans que la fonction de l'hôte ne soit altérée. Elles modifient l'actine des macrophages pour consolider leur vacuole et empêcher la rupture. La libération de *Chlamydia* de la cellule hôte peut se faire par cytolyse ou plus surprenant par exocytose laissant la cellule infectée intacte après son passage. Cette stratégie adoptée par la bactérie permet une infection silencieuse et chronique. (AbdelRahman et Belland 2005; Hammerschlag 2002).

8-2-2-4 Legionella pneumophila / Brucella abortus

Legionella comme *Brucella* modifie le trafic vésiculaire pour intercepter les vacuoles provenant du réticulum endoplasmique permettant aux bactéries un accès à la cystéine essentielle à leur survie et leur multiplication (**Figure 21**). Le phagosome décoré de ribosomes et ressemblant à un compartiment du réticulum endoplasmique ne fusionne pas

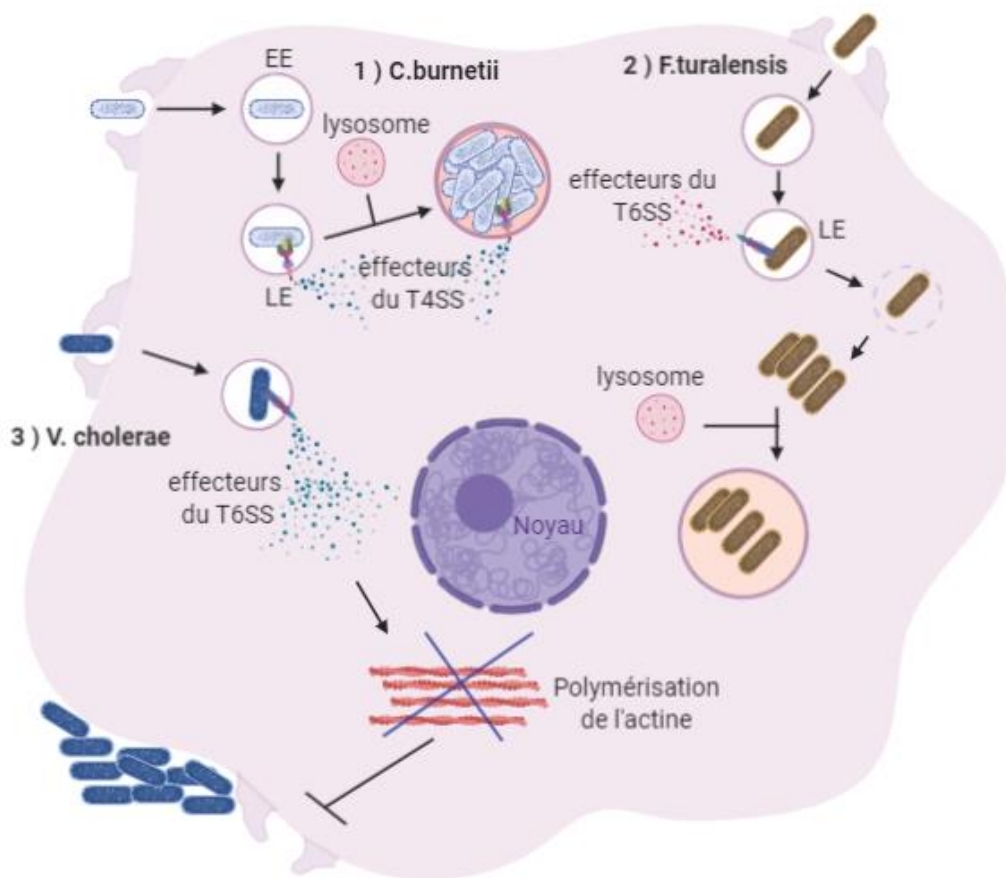


Figure 22 - Infection des macrophages par les bactéries pathogènes intracellulaires. 1- *Coxiella burnetii* est la seule bactérie se multipliant dans des vacuoles présentant des caractéristiques de phagolysosomes matures avec tous les stress présents. 2- *Francisella tularensis* sécrète des effecteurs *via* son T6SS pour modifier le trafic vésiculaire et se libérer de la vacuole au stade endosome tardif (LE). Elle se multiplie ensuite dans le cytoplasme. Elle est parfois retrouvée dans des vacuoles présentant des caractéristiques des lysosomes. *Vibrio cholerae* sécrète des effecteurs *via* son T6SS pour empêcher la polymérisation de l'actine des macrophages et inhiber la phagocytose de ses congénères.

avec les lysosomes et ne devient donc pas acide (Celli et al. 2003; Kagan et Roy 2002). *Legionella* utilise un appareil de sécrétion de type IV pour libérer dans le cytoplasme des effecteurs influençant le routage des vacuoles provenant du réticulum.

8-2-2-5 *Coxiella burnetii*

Coxiella fait office de cas particulier, contrairement aux autres bactéries intracellulaires, elle agirait comme une bactérie acidophile et son métabolisme serait stimulé dans un environnement acide. Elle va dans ce sens favoriser la fusion avec les endosomes, les lysosomes et des vacuoles de l'autophagie (**Figure 22**). La fusion de ces diverses vacuoles va lui permettre la création à partir des membranes dérivées, d'un grand compartiment répliatif comprenant un pH acide, des protéases actives et à sa surface les marqueurs lysosomaux LAMP (Graham et al. 2013). La fusion des vacuoles endosomales serait vectrice de nutriments nécessaires à la multiplication du pathogène qui est auxotrophe pour 11 acides aminés (Sandoz et al. 2016). La création de cette vacuole de réplication semblable à un phagolysosome atypique est hautement régulée par la bactérie puisqu'elle va prendre 4h dans les conditions d'infection avec *Coxiella* alors qu'elle prend environ 30min avec des billes de latex ou avec *Coxiella* inactivée. Il s'avère que dès son entrée *Coxiella* provoque le remodelage de sa vacuole pour lui faire acquérir des protéines de la voie autophagique comme LC3, c'est cette modification qui retarderait la fusion avec les lysosomes. *Coxiella* possède un appareil de sécrétion de type IV pour l'aider à la formation de la niche de multiplication dans le macrophage. La plupart des effecteurs nécessaires à la maturation de cette vacuole de multiplication sont encore inconnus (Lührmann, Newton, et Bonazzi 2017; Hayek, Berens, et Lührmann 2019) .

8-3 Infection des macrophages par LF82 :

Le processus infectieux de la bactérie LF82 dans les macrophages est très différent des bactéries intracellulaires décrites dans les paragraphes précédant. Une fois la barrière intestinale franchie, les bactéries se retrouvent dans la *lamina propria* qui contient un grand nombre de macrophages circulants destinés à la reconnaissance et la destruction des pathogènes s'y trouvant. LF82 présente la capacité de survivre et de se multiplier dans les

macrophages sans induire la mort de l'hôte contrairement à d'autres souches pathogènes d'*E. coli* comme les EIEC, EPEC et ETEC qui sont cytotoxiques après 24h d'infection des macrophages. Les macrophages sont en permanence stimulés par la présence de LF82 intracellulaire et produisent de manière continue du TNF- α (Glasser et al. 2001). LF82 est contenue dans un phagosome décoré de Rab5 et de Rab7 indiquant sa maturation jusqu'à un stade tardif. Puis la vacuole perd Rab7 et présente les caractéristiques des phagolysosomes mûres. La présence de la protéine LAMP1 dès 1h post infection suggère une fusion rapide des vacuoles contenant LF82 avec les lysosomes. LF82, donc, ne détourne pas la voie phagolysosomale et utilise le phagolysosome mûre comme niche de multiplication (**Figure 23**).

LF82 ne semble pas détoxifier son environnement puisque la maturation du phagolysosome contenant LF82 s'accompagne de la présence d'hydrolase Cathepsine D et d'un pH acide permettant son activité. Le compartiment dans lequel se trouve LF82 ne présente pas non plus de marqueur de la voie d'autophagie qui est bloquée par la bactérie comme c'est le cas dans les cellules épithéliales (Bringer et al. 2006b). L'acidité présente dans l'environnement vacuolaire de LF82 semble favoriser l'expression de facteurs de virulence nécessaire à sa survie et à sa multiplication dans les macrophages. À ce jour, aucun facteur spécifique à LF82 n'a été clairement identifié expliquant cette stratégie et sa pathogénicité, mais certains facteurs partagés avec d'autres pathogènes intracellulaires ont été mis en évidence chez LF82 pour contribuer à l'infection des macrophages.

8-3-1 Blocage de l'apoptose

La mort cellulaire programmée est l'un des moyens de défense de l'hôte pour éliminer une niche infectieuse. Empêcher la destruction de la cellule hôte permettraient au pathogène de s'y multiplier et offrirait ainsi un environnement de persistance idéale. Les caspases, de la famille des protéases sont impliqués dans le processus d'apoptose. Séparés en deux groupes, il y a les caspases initiatrices du processus (caspase 2, 8, 9 et 10) et les caspases effectrices (caspase 3,6 et 7) (Fink et Cookson 2005). Lors de l'infection des macrophages par la bactérie LF82, il a été observé un taux élevé de la protéase caspase 3 acheminées vers les

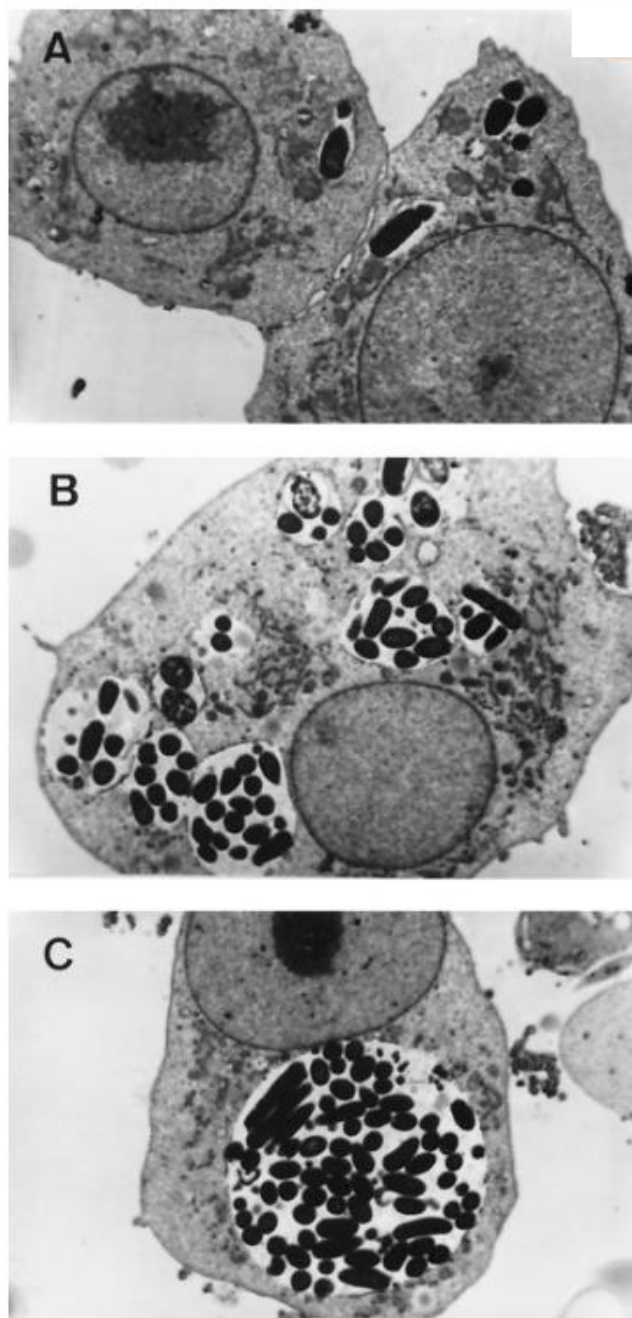


Figure 23 - Infection des macrophages par LF82. Microscopie électronique des macrophages J774-A1 infectés à une MOI de 10 bactéries par cellule. **A** - Une heure après l'infection, la bactérie AIEC LF82 est observée dans de petites vacuoles. **B** - la taille des vacuoles augmente après 8h de traitement à la gentamycine **C**- fusion des phagosomes conduisant à la formation d'une grande vacuole observée après 24 h. Grossissement 7200 × (Glasser et al. 2001).

protéasomes pour leur dégradation, un tel mécanisme inhibe le processus d'apoptose et entretient l'inflammation (K. A. Dunne et al. 2013).

8-3-2 TNF- α et l'homéostasie du fer

La production de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α (facteur de nécrose tumorale alpha) est à double tranchant pour l'hôte. C'est une cytokine pléiotrope principalement produite par les monocytes et les macrophages, elle est induite dans la réponse immunitaire de l'hôte anti virale, parasitaire, fongique et bactérienne. Le TNF- α malgré son importance dans la défense immunitaire peut également participer à la pathogénese en augmentant l'inflammation et participe ainsi aux lésions tissulaires et l'accroissement des symptômes comme c'est le cas dans la MC.

Les macrophages infectés par LF82 sécrètent une plus grande quantité de TNF- α , proportionnelle à la quantité de LF82 présentes dans la cellule entraînant une boucle d'amplification entre la sécrétion et la multiplication de la bactérie (Bringer et al. 2012). Ce mécanisme est similaire pour *M. tuberculosis* (Engele et al. 2002) et *L. pneumophila* (Skerrett et Martin 1996), mais inverse pour d'autres pathogènes comme *Brucella* et *Francisella tularensis*.

Une hypothèse possible sur l'avantage d'une surproduction de TNF pour les bactéries intracellulaires est l'interférence de la cytokine avec la mort cellulaire, le blocage de l'apoptose par la bactérie favoriserait la conservation de la niche intracellulaire, perturberait l'homéostasie cellulaire et augmenterait l'inflammation exacerbant les symptômes de la MC. Cette inflammation aurait également des effets sur le microbiote, la communauté microbienne de l'intestin est altérée par une réponse pro-inflammatoire trop forte et favorise l'implantation de LF82. De plus, la sécrétion importante de TNF altère l'intégrité de la barrière intestinale et favorise l'expression de CEACAM6 à la surface des cellules épithéliales de l'intestin favorisant l'entrée de LF82 et renforçant ainsi le cycle d'infection-inflammation.

Une autre hypothèse, qui serait en lien avec mes résultats de thèse, est que le TNF- α est impliqué dans l'augmentation de la disponibilité en fer dans les macrophages. En effet, les

cytokines TNF- α , IL-1 et IL-6 affectent l'homéostasie du fer en permettant la rétention du métal par augmentation de la transcription et de la traduction des ferritines, principale protéine de stockage du fer (Torti et Torti 2002). Le fer est ainsi séquestré dans le système réticulo-endothéliale des macrophages pour limiter sa disponibilité pour les pathogènes extracellulaires (Nairz et al. 2014). De nombreux pathogènes intracellulaires nécessitent un apport suffisant en fer pour se multiplier dans les macrophages. Le fer agit en tant que composant catalytique des enzymes qui interviennent dans de nombreuses réactions redox essentielles pour la production d'énergie et le métabolisme intermédiaire, il est également impliqué dans les réponses aux stress, la mobilité et la formation de biofilm (McHugh et al. 2003; Seo et al. 2014). Plusieurs systèmes d'acquisition de fer ont été développés par les pathogènes comme facteurs de virulence (**voir Partie 3 - 7**).

Chez la bactérie LF82, l'analyse du génome a mis en avant divers systèmes impliqués dans la capture du fer. Plusieurs îlots génomiques acquis horizontalement ont été identifiés chez LF82 (**Figure 24**), ces îlots de pathogénicité ou métaboliques sont essentiels chez de nombreux pathogènes. Ils contribuent à l'évolution des bactéries et reflètent la spécialisation des pathogènes en fonction des niches colonisées. LF82 a 4 îlots génétiques décrit actuellement comme îlots de pathogénicité et contenant de potentiels facteurs de virulences pour l'infection du tractus intestinal (Miquel, Peyretailade, et al. 2010a). Parmi eux l'îlot de pathogénicité numéro 2 contient un des gènes nécessaires à la synthèse, l'export et la capture d'un sidérophore identique à ceux de *Yersinia Pestis*. Il est appelé High Pathogenicity Island (HPI). HPI est présent également sur l'îlot de pathogénicité IV des UPEC. Des tests de croissance de la souche CUMT8 AIEC en présence d'un chélateur de fer a inhibé sa croissance sous-entendant l'essentialité du fer dans la croissance des AIEC (Dogan et al. 2014). Mes expériences ont révélé que cet îlot spécialisé dans la captation du fer est un facteur clef dans la virulence de LF82 pour coloniser les macrophages (Article 2).

8-3-3 HtrA:

La protéine de stress HtrA a été identifiée comme essentielle à la bactérie LF82 pour la multiplication dans les phagolysosomes des macrophages (Bringer et al. 2005a). HtrA est une protéine de choc thermique de la famille des protéases chaperonnes. Dans un

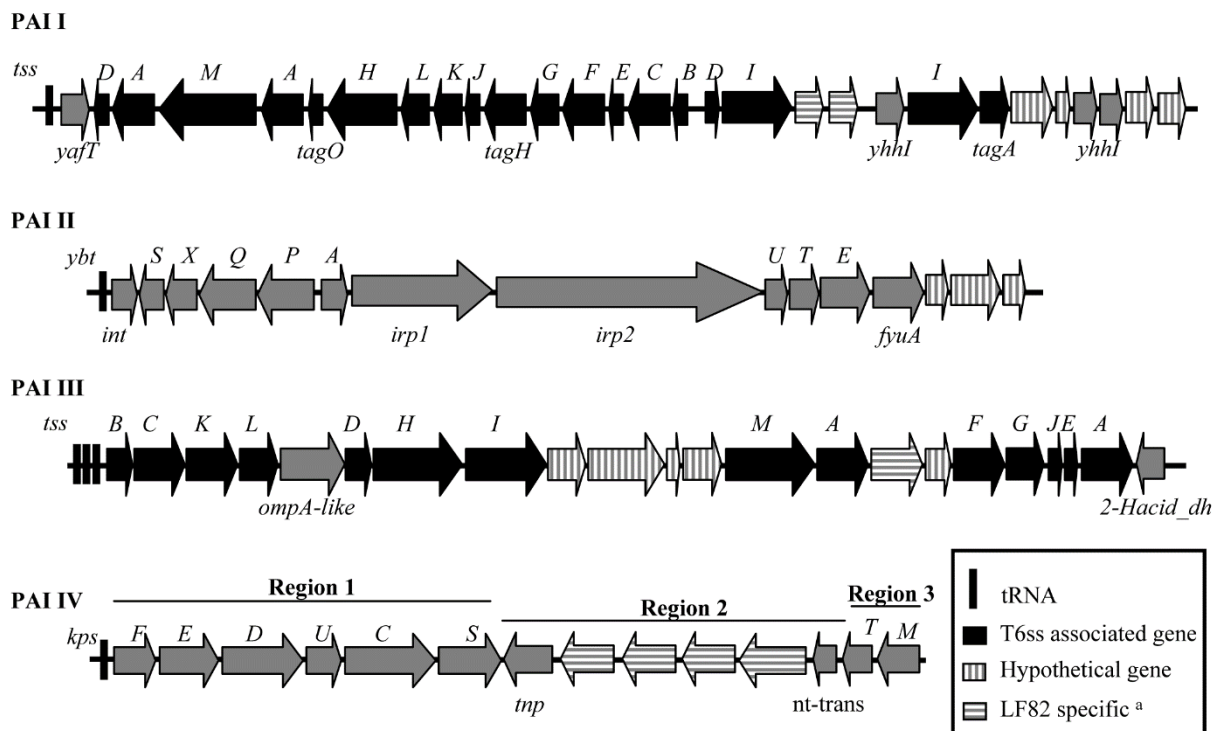


Figure 24 - Organisation du génome de quatre îlots pathogènes (PAI) de LF82 porteurs de gènes liés à la virulence. PAI I et PAI III présentent des gènes codant pour le système de sécrétion de type VI (T6SS), PAI II est similaire à l'îlot de pathogénicité de *Yersinia*. Les flèches noires indiquent les gènes associés au T6SS, les flèches grises indiquent les gènes avec des fonctions attribuées. En fonction de l'inclinaison, les flèches hachurées représentent des protéines hypothétiques ou des protéines spécifiques des AIEC. (Miquel, Peyretailade, et al. 2010a)

environnement stressant les protéases chaperonnes reconnaissent et évitent la formation d'agrégats par des protéines endommagées (Clausen, Southan, et Ehrmann 2002). HtrA a été initialement mis en évidence chez un mutant d'*E. coli* incapable de se répliquer à des températures élevées (Lipinska et al. 1989). Chez LF82 HtrA est impliquée dans la croissance dans le phagosome, le gène est 38 fois plus exprimé dans le macrophage que dans le milieu. De manière surprenante cette surexpression n'est pas observée si *E. coli* K12 est phagocytée. HtrA semble impliquée dans la résistance au stress oxydatif causé par la présence de peroxyde d'hydrogène dans les phagolysosomes (Bringer et al. 2005a). Le gène *htrA* peut être également induit en présence d'un pH acide et d'un environnement pauvre en nutriments. D'autres études ont démontré l'importance de cette protéine dans la survie intra macrophages chez *S. enterica* (Bäumler et al. 1994), *Y. enterocolitica* (S. R. Li et al. 1996) et *L. pneumophila* (Pedersen et al. 2001). Le rôle de HtrA pourrait être la dégradation des protéines mal repliées, mais elle pourrait également aider aux repliements et à l'exportation des facteurs de virulence de LF82 comme c'est le cas chez d'autres pathogènes comme *Shigella flexneri* (Purdy, Hong, et Payne 2002) ou *Streptococcus pyogenes* (Lyon and Caparon, 2004).

8-3-4 Proteine Dsb:

Les facteurs de virulence exprimés par les bactéries doivent pour la plupart être repliés avec des ponts disulfures (DSB) pour leur conférer stabilité et résistance (**Figure 25**). En l'absence de ces liaisons, les protéines sont rapidement dégradées et perdent leur activité dans l'environnement extracellulaire (Heras et al. 2009). Le système DSB, présent chez certaines bactéries et bien caractérisé chez *E. coli* K12, catalyse dans le périplasma, le repliement de ces structures par oxydation. Les protéines DsbA et DsbB sont impliquées dans la biogenèse des toxines et des facteurs de virulence chez de nombreuses bactéries. De nombreux modèles ont démontré une virulence atténuée des mutants d'une de ces protéines. Le système DSB intervient notamment dans la biogenèse de la toxine cholérique de *Vibrio cholera* (J. Yu, Webb, et Hirst 1992), l'endotoxine d' *E. coli* entéropathogènes (Miki et al. 2008), l'assemblage du système de sécrétion de type 3 de *Shigella flexneri* (Watarai et al. 1995) et le fimbriae des UPEC essentiel à l'adhésion aux cellules épithéliales ainsi que leur flagelle (Jacob-Dubuisson et al. 1994) . L'importance du

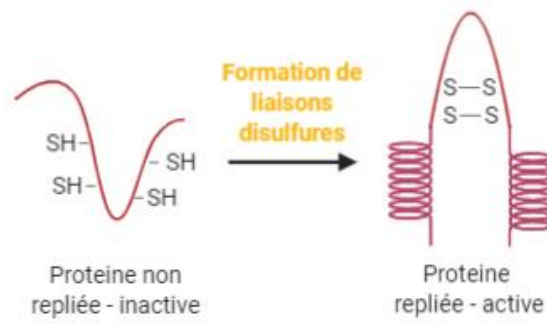


Figure 25 - Création de liaisons disulfures pour stabiliser les protéines.

gène *dsbA*, a été mise en évidence chez LF82 au cours de l'infection. Son expression est fortement augmentée au cours de l'infection des macrophages et un mutant LF82 de ce gène perd son habilité à survivre et se multiplier dans les phagolysosomes. Sa capacité à adhérer aux cellules épithéliales et les envahir est également altérée, le mutant présente un défaut d'assemblage du flagelle et ne synthétise pas le pili de type 1 essentiel dans l'infection des cellules épithéliales (Bringer et al. 2007b). Les rôles de DsbA chez LF82 sont donc multiples et à différentes étapes de l'infection. Dans les macrophages, l'absence d'expression de DsbA induit une disparition de LF82 équivalente à celle d'une souche K12. Cette protéine est essentielle pour faire face aux conditions stressantes présentes dans le macrophage, *in vitro* dans des conditions similaires, pH acide et carence en nutriment, le mutant LF82 $\Delta dsbA$ n'a pas pu se multiplier aussi efficacement que LF82 WT et sa viabilité a même été réduite après 24h de culture (Bringer et al. 2007b).

8-4 Infection des neutrophiles par LF82

La bactérie LF82 est également capable de se multiplier dans les neutrophiles recrutés sur le lieu de l'inflammation dans l'intestin, mais son comportement est très différent de celui adopté dans les cellules épithéliales et les macrophages. Les LF82 se retrouvent après 2h d'infection, dans 17% des cas, dans le cytosol des neutrophiles. Elles peuvent subvertir la voie de l'autophagie pour se retrouver dans une vacuole colocalisant avec les marqueurs des autophagosomes (LC3 et Lamp), mais non acidifiée. LF82 induit la mort autophagique des neutrophiles 4h après leur infection (Chargui et al. 2012). La mort autophagique est une mort cellulaire non apoptotique due à un stress prolongé des cellules, cette mort se déclenche par l'accumulation de vésicules autophagiques dans le cytosol.

9- Comparaison des génomes et hypothèses de travail :

La majorité des pathogènes intracellulaires contrôlent les mécanismes de défense mis au point par l'hôte en interférant avec la voie endocytaire (voir Partie 3 – 8-2-2). Ces stratégies semblent très différentes de celle utilisée par la bactérie LF82 qui se multiplie dans des phagolysosomes mûres. En ce sens, la tolérance de LF82 face aux stress présents dans le phagolysosome est remarquable. Pour tenter d'élucider les caractéristiques clefs de la

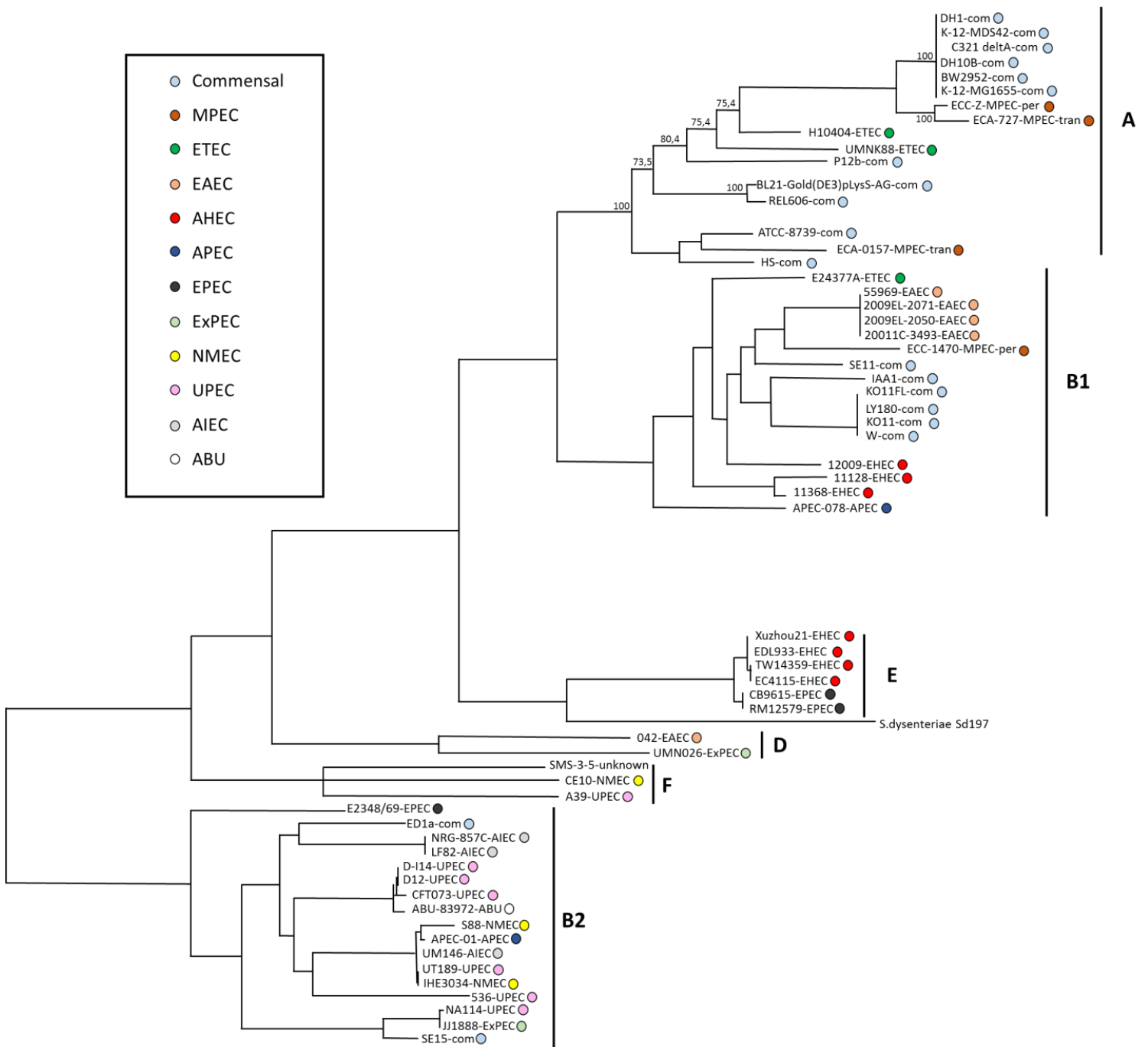


Figure 26 - Phylogénie à probabilité maximale générée à partir de 16 062 SNP. Les valeurs de support Bootstrap sont affichées sur les branches. Les longueurs de branches sont tracées proportionnellement à la proportion de changement de séquence. L'adhésion au phylogroupe est indiquée par une barre horizontale et la lettre correspondante. Les pathotypes de chacune des souches d' *E. coli* sont indiqués avec un code de couleur et leur abréviation alphabétique adjacente au nom de la souche; les souches commensales sont abrégées en «com». (Richards et al. 2015)

pathogénicité de la souche AIEC LF82 et identifier de nouveaux facteurs de virulence, il est intéressant de se pencher sur son génome et sur les pressions de sélection qu'il a pu subir pour maintenir les éléments nécessaires pour qu'une *E. coli* se fixe aux cellules épithéliales et survive dans les macrophages. Il est intéressant de garder en perspective que dans le contexte de la maladie de Crohn ces étapes peuvent être facilitées par les polymorphismes de l'hôte. La coexistence dans les mêmes macrophages de LF82 et de bactéries pathogènes pourrait expliquer l'acquisition de facteurs de virulence par transfert horizontal de gènes. L'objectif de ma thèse était, en utilisant les méthodes de biologie cellulaire et de génomique utilisées principalement pour l'étude des bactéries non pathogènes de laboratoire, de caractériser la stratégie employée par LF82 pour sa survie et sa multiplication dans les phagolysosomes des macrophages. Un des éléments intéressants du génome de LF82 est la présence d'un grand plasmide de 108 379pb pauvre en GC (46%, alors que le chromosome est à 50%) laissant suspecter une acquisition par transfert horizontal. Les ulcères de la muqueuse, les abcès et le recrutement des macrophages observés dans la MC sont des manifestations pathologiques également observées chez les bactéries *Salmonella* et *Yersinia* (John HE Nash et al. 2010). La comparaison avec les génomes de ces bactéries est intéressante. L'annotation du plasmide de LF82 a fait émerger 121 CDS similaires à ceux des plasmides pHCM2 et pMT1 respectivement chez *Salmonella typhimurium* et *Yersinia* (Hu et al. 1998; Miquel, Peyretailade, et al. 2010a; Parkhill et al. 2001). La synténie observée entre le plasmide de LF82 et le plasmide pHCM2 est de 71% elle est plus faible (50%) avec pMT1. Les plasmides de ces trois souches contiennent 24 CDS communs, retrouvés chez aucune autre séquences génomiques disponibles (Miquel, Peyretailade, et al. 2010a). Nous avons observé que l'expression de nombreux gènes de ce plasmide était induite lors de l'infection, la plus part de fonction inconnue. Pour le moment, il a été impossible de curer ce plasmide (données du laboratoire), il n'a donc pas été possible de tester son implication dans la pathogénicité, mais sa présence suggère que des stratégies pathogéniques similaires existent entre les trois espèces.

Il est également intéressant de comparer la phylogénétique de la souche LF82. LF82 est regroupé dans le groupe B2 avec les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) impliqués notamment dans les infections des voies urinaires avec les UPEC (**Figure 26**). Comme mentionné plus haut dans cette introduction, il a été identifié 4 îlots de pathogénicité (PAI)

potentiels sur la base de leur homologie avec ceux présents chez les ExPEC. Le PAI I et PAI III portent tous deux, des systèmes de sécrétion putatifs de type VI. Le PAI I a une organisation génétique très proche de celle retrouvée pour un îlot présent sur la plupart des souches ExPEC. Le PAI III également proche d'un autre îlot présent chez les ExPEC contient également une protéine de fonction inconnue mais conservée chez *Yersinia kristensenii*. De plus, le PAI II de LF82 est très similaire à la région centrale du HPI de *Yersinia sp.* codant pour le système de sidérophore yersiniabactine. Le PAI II de LF82 retrouve également une homologie de séquence avec le PAI IV de la souche UPEC 536. Le gène *FyuA*, le récepteur de la yersiniabactine est l'un des plus fortement régulés dans la formation de biofilm des souches UTI. Cette observation semble également une piste intéressante pour décrypter la virulence de la souche LF82 AIEC puisque les AIEC sont de très gros producteurs de biofilm (Martinez-Medina, Naves, et al. 2009), c'est une de leur caractéristique phénotypique.

En conclusion, les souches AIEC se regroupent génétiquement avec les ExPEC et partagent certains de leurs traits phénotypiques, notamment leur capacité à coloniser les cellules épithéliales de la muqueuse, à envahir les cellules hôtes eucaryotes et à induire des réponses inflammatoires chez les animaux hôtes ; on peut donc penser observer des similitudes dans leurs stratégies de colonisation de leurs hôtes.

Partie 5 : Formation de biofilm comme stratégie invasive

1 Les généralités sur les biofilms

1-1 Définition des biofilms

Un biofilm est une communauté de microorganismes adhérents entre eux et à une surface ou interface. L'adhérence entre les microorganismes est créée par une matrice composée de polymères extracellulaires (EPS) sécrétée par les microorganismes eux-mêmes. Sous forme de biofilm, le taux de croissance des microorganismes impliqués ainsi que les gènes transcrits diffèrent des microorganismes sous forme planctoniques (Donlan et Costerton 2002).

Le biofilm est un mode de vie adopté très fréquemment dans la nature, les espèces capables d'en former sont donc très variées. Les biofilms retrouvés dans la nature sont rarement mono-espèce et peuvent présenter une grande complexité de population microbienne. La capacité à former des biofilms concerne les eucaryotes comme les procaryotes, parmi eux les virus, champignons, bactéries et archae. Des relations symbiotiques se mettent en place à l'intérieur des biofilms multi-espèces. En effet, les sous-produits métaboliques créés par un des microorganismes peuvent servir à la croissance des autres ou bien l'adhésion peut permettre de fournir le ligand permettant la fixation d'une autre espèce présente. L'adoption d'un tel mode de vie s'est révélée avantageuse pour la plupart des microorganismes pour survivre dans des environnements hostiles et coloniser de nouvelles niches. L'architecture d'un biofilm est complexe et fait intervenir notamment des canaux pour permettre le passage de fluides et de nutriments. Cette architecture et la nature de la matrice extracellulaire varient fortement en fonction des microorganismes concernés, de l'hétérogénéité du biofilm et des conditions de formation de celui-ci (P. S. Stewart et Franklin 2008; Fong et Yildiz 2015).

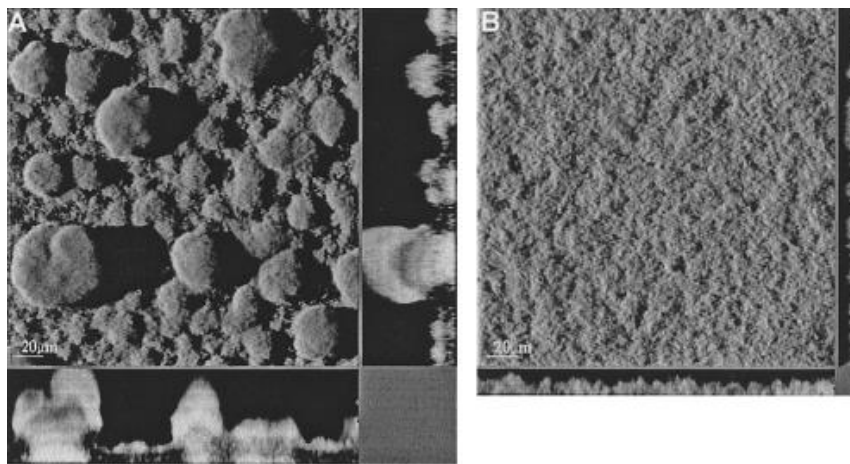


Figure 27 - Impact de l'environnement sur le développement des biofilms de *P.aeruginosa*. Micrographies de biofilm de *P. aeruginosa* PAO1 âgés de 5 jours cultivés sur du milieu minimum supplémenté en glucose (A), ou en citrate (B) Les images centrales montrent des projections de fluorescence de haut en bas et les images latérales montrent des coupes verticales. (Klausen et al. 2003)

1-2 Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire entourant la communauté bactérienne a des propriétés physiques et chimiques variant en fonction des conditions et des organismes concernés. Elle est très hydratée puisque l'eau y est intégrée dans sa structure par des liaisons hydrogènes ; ceci empêchant la dessiccation du biofilm. La matrice est composée majoritairement de polysaccharides extracellulaires (Donlan 2002). Viennent s'ajouter à sa composition d'autres composés mineurs tels que des lipides, des protéines, des acides nucléiques extracellulaires et d'autres composés inorganiques comme des phosphates et des sulfates provenant des bactéries en lyse et du milieu extérieur (Flemming et Wingender 2010a; Seviour et al. 2019). La conformation de la matrice est déterminée par les polysaccharides s'y trouvant, la rendant plus ou moins soluble dans l'eau. La matrice extracellulaire est aussi très dynamique et n'est pas uniforme dans sa composition, dans sa forme, dans le temps et l'espace (Leriché, Sibille, et Carpentier 2000). La composition et l'aspect de la matrice extracellulaire varient en fonction de la composition nutritionnelle du milieu, du support de croissance, du patrimoine génétique d'une souche et de la vitesse de croissance bactérienne (Mika et Hengge 2014). Dans une grande majorité des cas, la quantité de polysaccharides extracellulaires dans un biofilm *in vitro* augmente en fonction de l'âge du biofilm. *P. aeruginosa* produit des biofilms en forme de champignons lorsque le milieu est additionné de glucose et deviennent plats lorsque le milieu est additionné de citrate, de benzoate ou d'acides casaminés comme source de carbone (**Figure 27**) (Klausen et al. 2003).

Les rôles joués par la matrice extracellulaire sont multiples, elle permet la structure, l'alimentation et la protection de la communauté productrice. Les propriétés de sorption passive de la matrice lui permettent d'être une source de nutriment en capturant les éléments nutritifs présents dans le milieu de développement (Flemming et al. 2016). Les bactéries lysées dans la matrice peuvent également servir de source de nutriments aux bactéries survivantes, l'ADN libéré sert de source de phosphore, de carbone et d'énergie (López et al. 2009a).

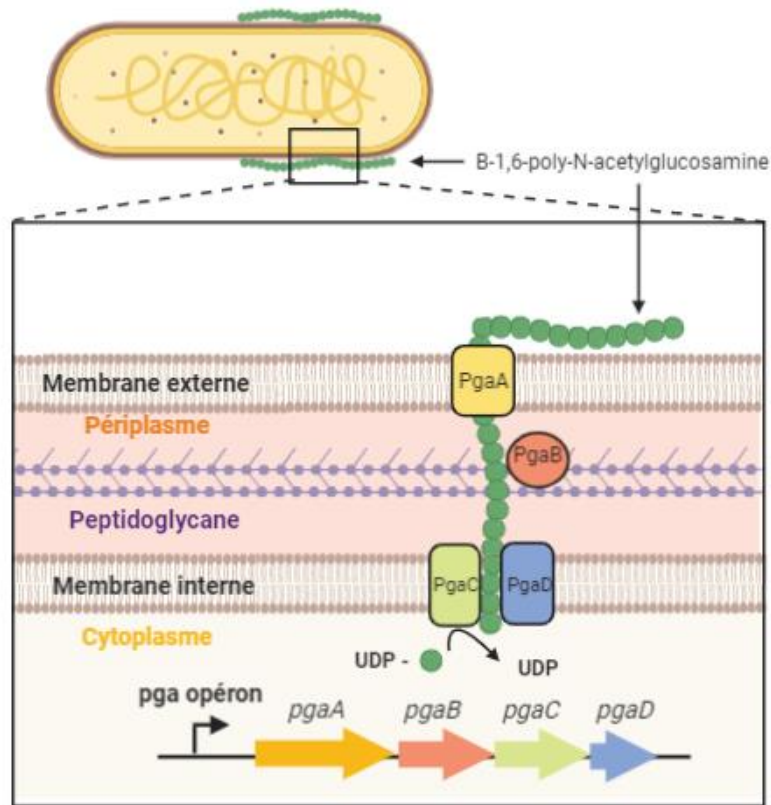


Figure 28 - Biosynthèse du *pga*. L'opéron *pga* code pour PgaC et PgaD, des protéines membranaires cytoplasmiques intervenant dans la polymérisation du N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) (rond vert). PgaC est responsable de l'assemblage de GlcNAc à partir du précurseur UDP-GlcNAc. La porine membranaire externe PgaA transloque les chaînes N-acetyl-glucosamine à la surface de la cellule. La lipoprotéine membranaire externe PgaB désacétyle le PNAG lors de l'exportation introduisant une quantité limitée de glucosamine dans le polymère. Figure adaptée de (Stevenson et al. 2018)

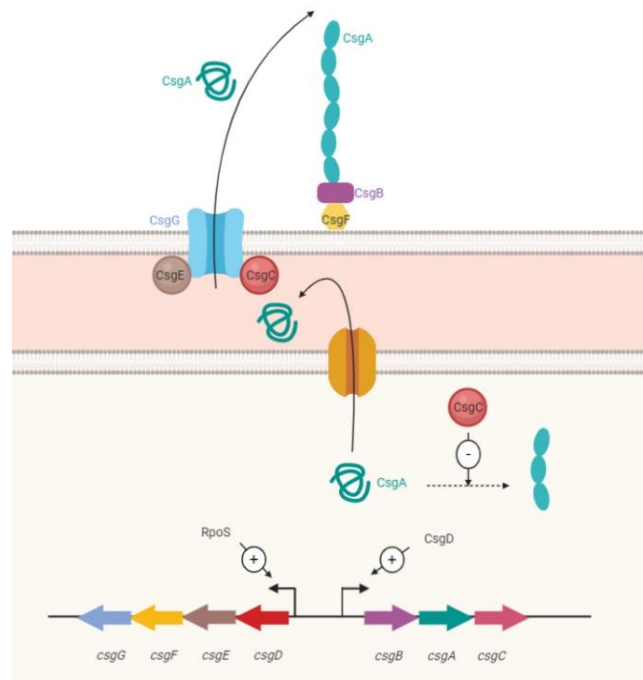


Figure 29 - Biosynthèse des curli. Rpos et CsgD influencent l'expression des opérons *csg*. CsgC empêche la nucléation de CsgA dans le cytoplasme de la bactérie. CsgE et CsgF assurent la translocation de CsgA. La fibre est assemblée dans le milieu extracellulaire à la surface de la bactérie.

1-2-1 Composition de la matrice extracellulaire:

Chez *E. coli* K12 *in vitro* les principaux composants conservés du biofilm mature sont les fibres protéiques appelés curli, la cellulose, le β -1,6- *N*-acétyl-D-glucosamine (PGA) et l'acide colanique (Prigent-Combaret et al. 2000; X. Wang, Preston, et Romeo 2004). La présence d'adhésines et de flagelles facilite la fixation des bactéries aux surfaces.

1-2-1-1 β -1,6- *N*-acétyl-D-glucosamine (PGA)

Le polymère de poly- β -1,6-GlcNAc (PGA), appelé adhésine extracellulaire polysaccharidique, est fabriqué et exporté par l'opéron *pgaABCD* chez *E. coli* K-12 (**Figure 28**). (Itoh et al. 2008; X. Wang, Preston, et Romeo 2004). Le PGA est impliqué dans la colonisation, la virulence et l'évasion immunitaire des espèces Gram positif et négatif (Cerca et al. 2007; Izano et al. 2007; Vuong et al. 2004; Kwan et Withers 2014). C'est un polysaccharide capsulaire nécessaire pour l'adhésion cellule à cellule et cellule à surface dans le contexte du biofilm. Il joue également un rôle important dans la structure du biofilm en permettant sa stabilisation. Sa synthèse chez *E. coli* se fait au niveau des pôles de la bactérie et permet un attachement polaire aux surfaces (Itoh et al. 2008).

1-2-1-2 Les curlis

Les curli font partie des composants protéiques principaux de la matrice des biofilms. Ce sont des fibres de protéines amyloïdes présentes à la surface des bactéries qui favorisent les interactions cellule-surface et cellule-cellule. Elles sont codées par deux opérons *csgBAC* et *csgDEFG*. L'opéron *csgBAC* code les deux composants de la fibre structurale qui sont CsgA et CsgB, et la protéine périplasmique accessoire CsgC (**Figure 29**). La fibre est majoritairement composée de polymères de la protéine CsgA accrochés à la membrane externe par CsgB. L'opéron *csgDEFG* code pour le régulateur CsgD, qui contrôle la production de curli et de cellulose, deux protéines accessoires putatives CsgE et CsgF et la protéine de translocateur CsgG (Hobley et al. 2015). Les sous-unités CsgA et CsgB de la fibre sont exportées à la surface de la membrane externe par l'intermédiaire du translocateur CsgG qui forme un

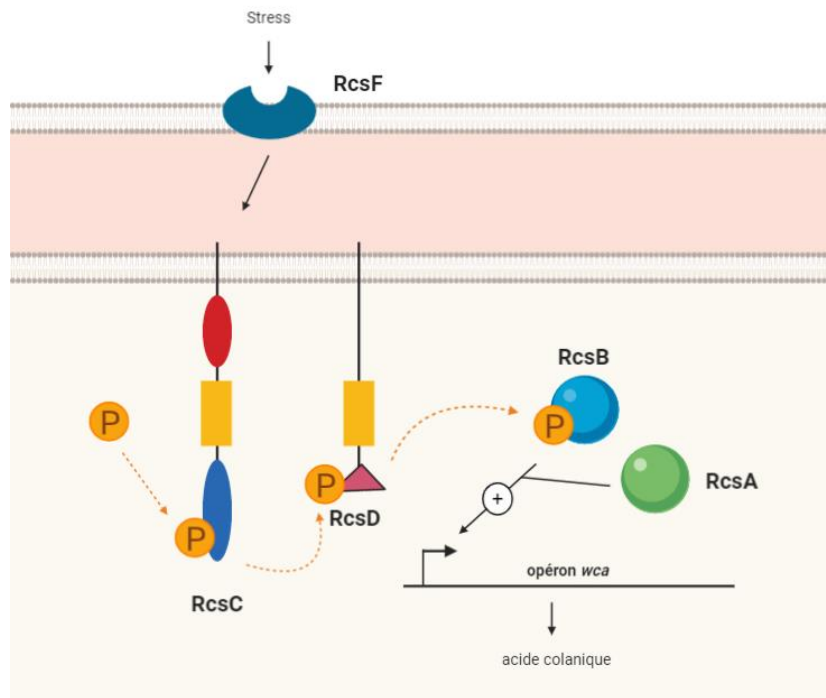


Figure 30 - Système phosphorelay *rscCDB*. Le phosphate (cercle jaune) est transféré de RcsC à RcsD puis à RcsB qui affecte la transcription de l'opéron *wca* responsable de la production de l'acide colanique.

pore à travers la membrane externe. Les protéines CsgC et CsgE ont un rôle de régulation de l'exportation par CsgG. CsgC influence la vitesse de nucléation et d'élongation de CsgA et empêche l'accumulation de fibre amyloïdes dans le cytoplasme de la bactérie (Taylor et Matthews 2015; Evans et al. 2015). CsgF se trouve sur la membrane externe de la membrane, il interagit avec le translocateur CsgG et agit sur la nucléation de CsgA et CsgB (Hobley et al. 2015).

1-2-1-3 La cellulose

La cellulose est un polymère organique de glucose ayant un rôle de protection, architectural et régulateur sur la formation des biofilms. La cellulose permet en effet la résistance des biofilms à des traitements acides ou alcalins et confère une stabilité au biofilm en renforçant les interconnexions cellules-cellule en se liant de manière non covalente à des fimbriae (Zogaj et al. 2001). Chez *E. coli* et *Salmonella*, la morphologie et la structure tridimensionnelle des biofilms dépend des curli et de la présence de cellulose dans la matrice (Serra, Richter, et Hengge 2013). Les protéines BcsA et BcsB codées par l'opéron *bcsQABZC* sous l'influence du Di-guanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP), forment le complexe cellulose synthase insérée à la membrane permettant la conversion de l'UDP-glucose en cellulose (Jenal, Reinders, et Lori 2017). Ce processus est régulé par plusieurs protéines accessoires codées par les opérons *yhjR-bcsQABZC* et *bcsEFG* (Bokranz et al. 2005). La production de cellulose n'est pas obligatoire chez de nombreux *E. coli* pour la formation de biofilm (Da Re et Ghigo 2006). Elle peut même avoir des effets négatifs sur l'adhésion et l'agrégation de certains biofilms, il est envisageable qu'une surexpression de cellulose inhibe la formation de biofilm en recouvrant les curli (Gualdi et al. 2008).

1-2-1-4 Acide colanique

L'acide colanique est un polysaccharide ramifié composé de glucose, de galactose et d'acide glucuronique. Chez les entérobactéries, il est fabriqué et exporté par le cluster de gènes *wzA-C-wcaA-M*, ce cluster est lui-même régulé par le système Rcs phosphorelay (**Figure 30**). Le système Rcs est composé de RcsC qui a le rôle de senseur, RcsB qui permet la régulation de la réponse, RcsA le co-facteur et RcsD lié à la membrane interne est impliqué dans le

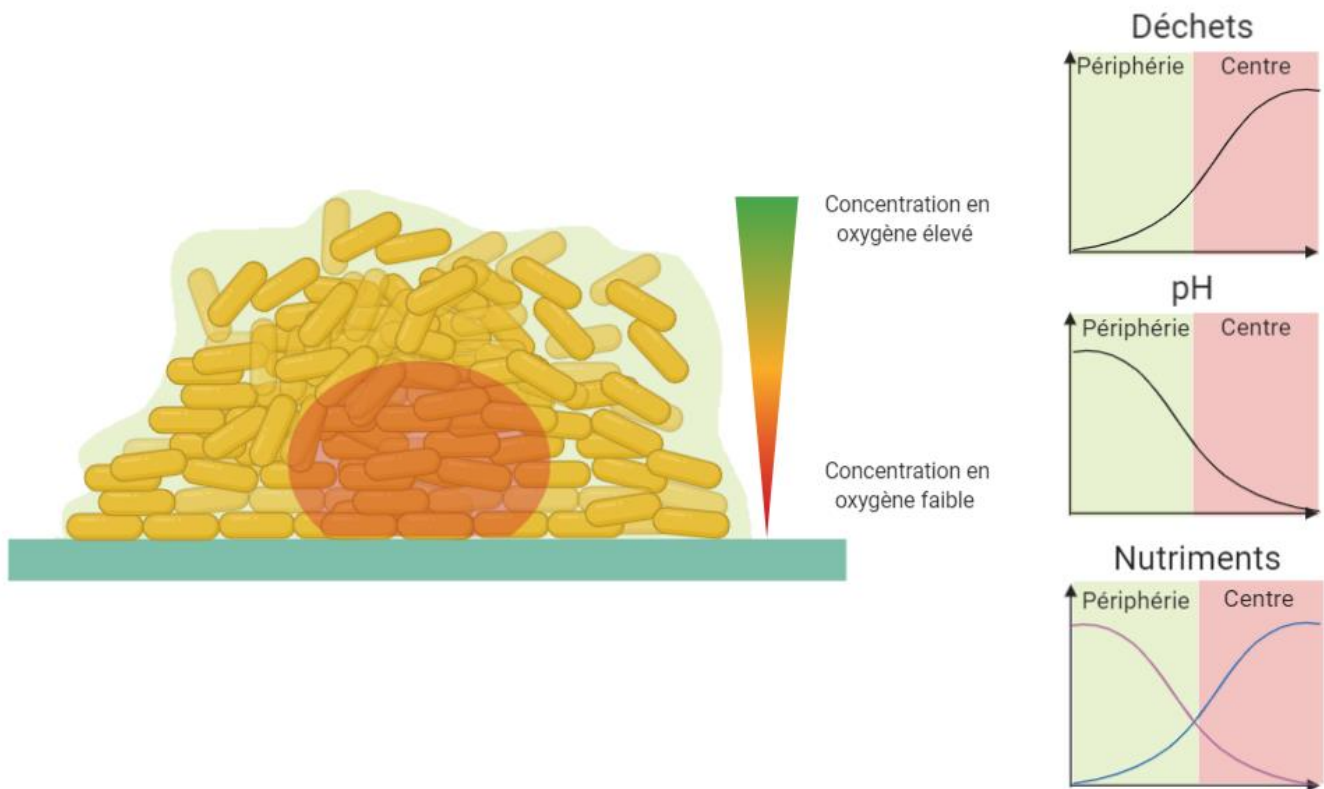


Figure 31 - Hétérogénéité chimique et physiologique des biofilms. La concentration en oxygène diminue vers le centre du biofilm. La production de déchets ainsi que le pH augmentent plus on s'approche du centre du biofilm. Si le biofilm se développe sur une source de nutriments comme une gélose, les nutriments seront accumulés au centre du biofilm (courbe bleue). A l'inverse le centre du biofilm sera très pauvre en nutriments s'ils sont apportés par le milieu extérieur (courbe violette).

transfert de phosphate. RcsC transfère un phosphate à RcsD, qui le transfère ensuite à RcsB. RcsB est un régulateur de transcription de type hélice-tour-hélice de la famille LuxR, qui se lie au promoteur de l'opéron *wca*, active la transcription et permet la production d'acide colanique par la bactérie (Majdalani et Gottesman 2005). Chez *E. coli* K-12, l'acide colanique est impliqué dans l'établissement de la structure tridimensionnelle du biofilm, il forme une capsule autour des bactéries exacerbant le phénotype de résistances face à des agents antimicrobiens (Limoli, Jones, et Wozniak 2015). Contrairement à d'autres espèces bactériennes, comme chez *V. cholerae* (Watnick et Kolter 1999) ou *S. epidermidis* (McKenney et al. 1998), il n'est pas nécessaire chez *E. coli* aux premiers stades de l'attachement aux surfaces abiotiques (Danese, Pratt, et Kolter 2000; Majdalani et Gottesman 2005).

1-3 Hétérogénéité chimique et physiologique des biofilms *in vitro*

Les conditions environnementales ainsi que les réponses physiologiques des bactéries au sein d'un biofilm sont très hétérogènes. L'apport de nutriment ainsi que la présence de déchets bactériens et d'oxygène au sein du biofilm suivent des gradients affectant le métabolisme et la morphologie des bactéries. Les gradients varient en fonctions des microorganismes impliqués, certains biofilms peuvent même être entièrement anaérobies comme ceux associés à la plaque dentaire (Kolenbrander 2000). La concentration en oxygène diminue à mesure que l'on s'approche du centre du biofilm, cette diminution est due à la diffusion de l'oxygène et à la respiration des bactéries elle-même. La concentration en nutriment diminue de la même manière plus on s'éloigne de la source d'éléments nutritifs, ainsi, si le biofilm se forme sur une gélose nutritive le gradient de nutriment sera inverse au gradient d'oxygène. Les produits métaboliques ainsi que les déchets ont une concentration plus élevée au centre du biofilm et plus faible à la périphérie (Serra et al. 2013). L'accumulation de déchets acides au centre du biofilm par ailleurs pourrait contribuer à abaisser le pH local. La distribution des molécules de signalisation, peptides antimicrobiens, produits métaboliques et autres, établissent un gradient de concentration dépendant de leur production, leur consommation ainsi que de leur diffusion. (P. S. Stewart 2003) (**Figure 31**). Chez *E. coli*, la limitation en oxygène n'est pas un facteur déterminant pour la croissance, les macrocolonies formées sur une gélose nutritive s'organisent en

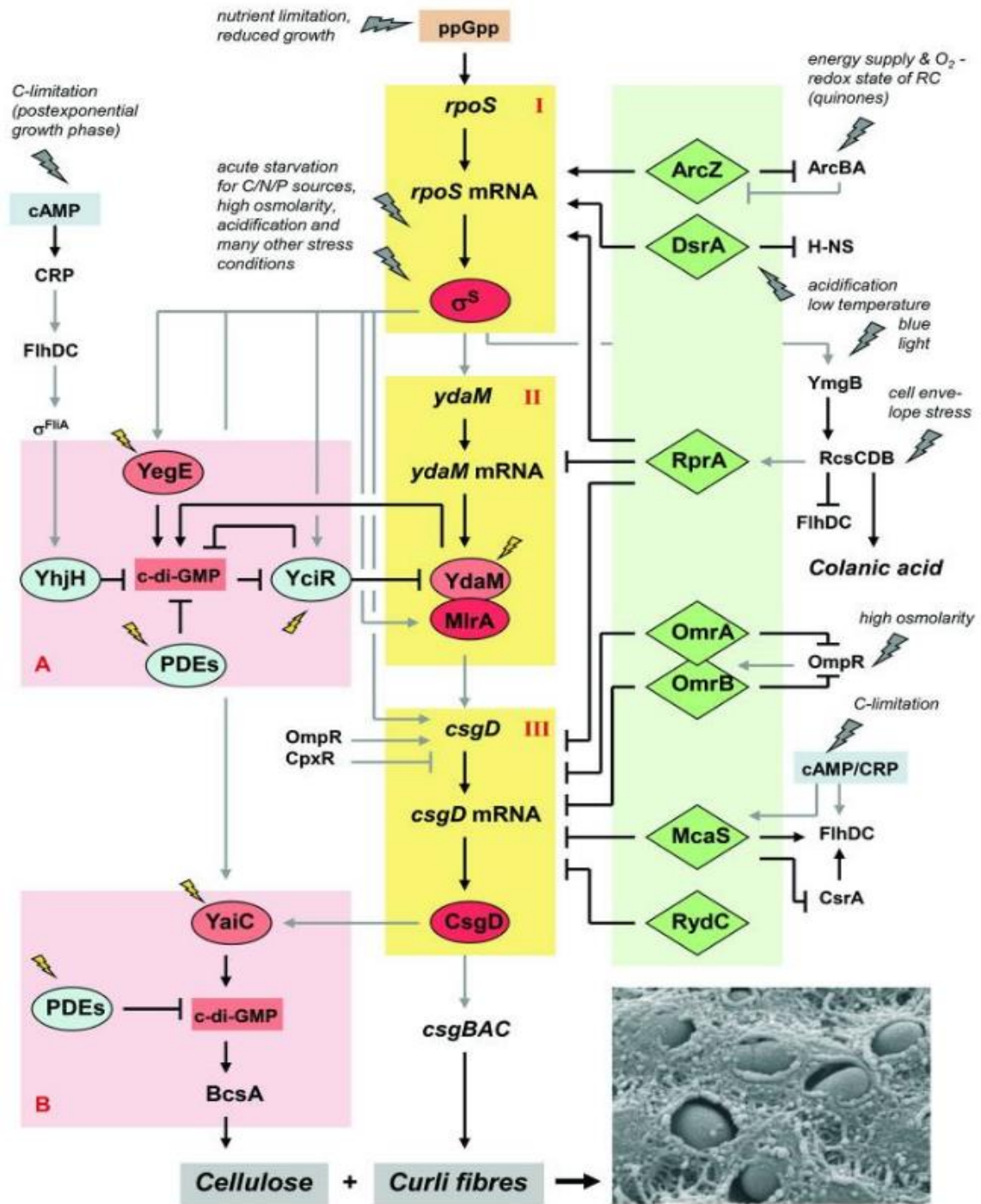


Figure 32 - Régulation de la production de cellulose et de curli. La régulation principale passe par les trois rectangles jaunes comprenant les facteurs de transcription principaux qui permettent la production de la matrice de cellulose et de curli. Le premier module est celui du régulateur principal RpoS, le second de *ydaM/MirA* et le troisième de *csgD*. La régulation de cette cascade est ensuite modulée par le cyclique-di-GMP, rectangles roses. La première régulation passe par l'inhibition d'*YciR* levant la répression de *YdaM/MirA*. Le second contrôle par le cyclique-di-GMP influence directement la production de cellulose par activation de *BcsA*. La régulation de la cascade principale peut ensuite être modulée par les ARN, rectangle vert. Sous l'influence de signaux environnementaux, ils peuvent intervenir tout au long de la cascade. Les connecteurs gris représentent l'activation (flèches) ou l'inhibition (en T) par des régulateurs. Figure adaptée de (Mika et Hengge 2014).

stratification avec les bactéries en croissance active au niveau de la couche inférieure du biofilm proche de la gélose nutritive. Au niveau de la couche périphérique se trouvent les bactéries en carence, ne se divisant pas et avec une morphologie plus petite caractéristique d'une phase stationnaire (Serra et al. 2013) .

Il a été observé chez *Bacillus subtilis* l'expression différentielle et stochastique, seulement chez une petite sous population au sein des biofilms, du gène *sinI* permettant l'expression d'un exopolysaccharide impliqué dans la formation de la matrice du biofilm (Chai et al. 2008). Ainsi l'hétérogénéité chimique des biofilms et l'expression stochastique des gènes des bactéries en fonction des différents sous environnement présents au sein du biofilm peuvent donner une explication à l'hétérogénéité phénotypique des bactéries au sein de la population.

Il a également été démontré la présence de variants génétiques apparaissant par mutation ou recombinaison à l'intérieur d'un biofilm (K. S. Koh et al. 2007; McEllistrem, Ransford, et Khan 2007; Valle et al. 2007; Allegrucci et Sauer 2007). Il a été découvert par exemple la coexistence de plusieurs génotypes de *P.aeruginosa* dans les poumons découlant tous du même isolat initial dans le contexte infectieux de la fibrose kystique. Les infections chroniques impliquant des biofilms pourraient contribuer à la diversité génétique des souches pathogènes (D. Nguyen et Singh 2006). L'ajout d'antibiotique pourrait augmenter la diversité des souches bactériennes infectantes et sélectionner des variants dominants très résistants.

2 La cascade de régulation de la matrice extracellulaire

La production de la matrice extracellulaire est contrôlée par le facteur de transcription central CsgD (Z. Liu et al. 2014). La cascade d'activation aboutissant à la production de curli et de cellulose passe par l'expression du facteur sigma RpoS, impliqué dans la réponse globale aux stress chez la bactérie, qui active le facteur de transcription MlrA et son coactivateur YdaM qui a son tour active CsgD (**Figure 32**) (Olsén et al. 1993; Mika et Hengge 2014).

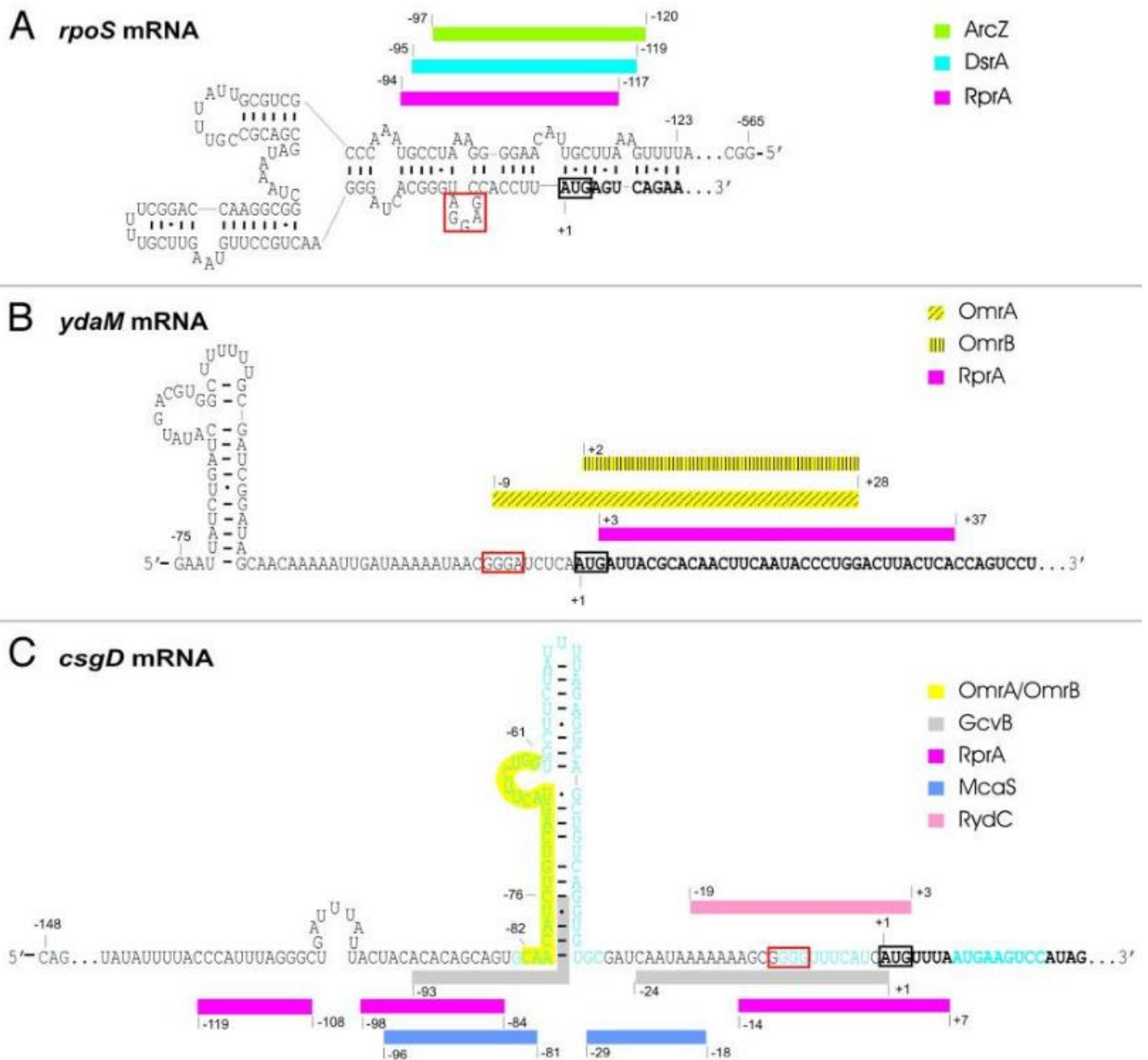


Figure 33 - Régulation des ARNm *rpoS*, *ydaM* et *csgD* via la partie 5'-UTR. A- Fixation des petits ARN régulateurs ArcZ, DsrA et RprA sur l'ARNm de *rpoS*. B- Fixation des ARN OmrA, OmrB et RprA sur l'ARNm d'*ydaM*. C- Fixation des ARN OmrA, OmrB, GcvB, RprA, McaS et RydC sur l'ARNm de *csgD*. (Mika et Hengge 2014)

Le module MlrA/YdaM est régulé par le messenger secondaire di-GMP-cyclique via l'enzyme YciR (Römling, Gomelsky, et Galperin 2005). Le di-GMP-cyclique est une molécule de signalisation intracellulaire régulant de nombreux comportements bactériens et notamment clef dans l'enclenchement du mode de vie planctonique à biofilm en intervenant dans la production d'exopolysaccharides, l'expression d'adhésines de surface et la dispersion de biofilm (Simm et al. 2004). Le di-GMP-cyclique intervient également dans la régulation du cycle cellulaire, la virulence des bactéries, la rotation du flagelle, la rétraction des pili de type IV, , les systèmes de sécrétion de type 6 (Moscoso et al. 2011) (Römling, Galperin, et Gomelsky 2013; Moscoso et al. 2011). Lorsque la bactérie est en croissance, la production de ci-di-GMP est très faible, l'enzyme YciR n'est pas réprimé et agit directement sur le système YdaM/MlrA en l'inhibant. Lorsque la quantité de ci-di-GMP, sous influence de RpoS activant YegE (ci-di-GMP synthase), augmente, la fonction de YciR est réprimée. YdaM déréprimé fonctionne comme une boucle de régulation positive en activant la production de ci-di-GMP à son tour et peut de nouveau activer les facteurs de transcription MlrA permettant l'initiation de la transcription de *CsgD*.

D'autres facteurs de régulation tels des ARN peuvent intervenir dans la modulation de la cascade, comme ArcZ, DsrA ou RprA agissant positivement sur l'ARNm de RpoS empêchant sa dégradation en réponse à divers stress environnementaux tels qu'un stress oxydatif, un pH acide, un changement de température ou un stress d'enveloppe (Mika et Hengge 2013; Majdalani, Hernandez, et Gottesman 2002; Mandin et Gottesman 2010; Lease et Belfort 2000).

OmrA, OmrB, McaS, RprA, GcvB et RydC eux sont des ARN, régulateurs négatifs de la cascade, ils répriment directement d'expression de *CsgD*. Ces six ARNs régulateurs se fixent grâce à Hfq sur la région 5'UTR de l'ARNm de *csgD* (**Figure 33**). (Ishikawa et al. 2012). OmrA et OmrB affecte la structure de l'ARNm de *csgD* empêchant le chargement des ribosomes en amont de la séquence SD. OmrA et OmrB sont activés par le système à deux composants EnvZ/OmpR en réponse à la faible osmolarité du milieu. Ce système est composé d'un capteur kinase EnvZ autophosphorylé en réponse à une forte osmolarité qui transfère son groupe phosphate au régulateur de réponse OmpR conduisant à la régulation des gènes cibles (Guillier et Gottesman 2006).

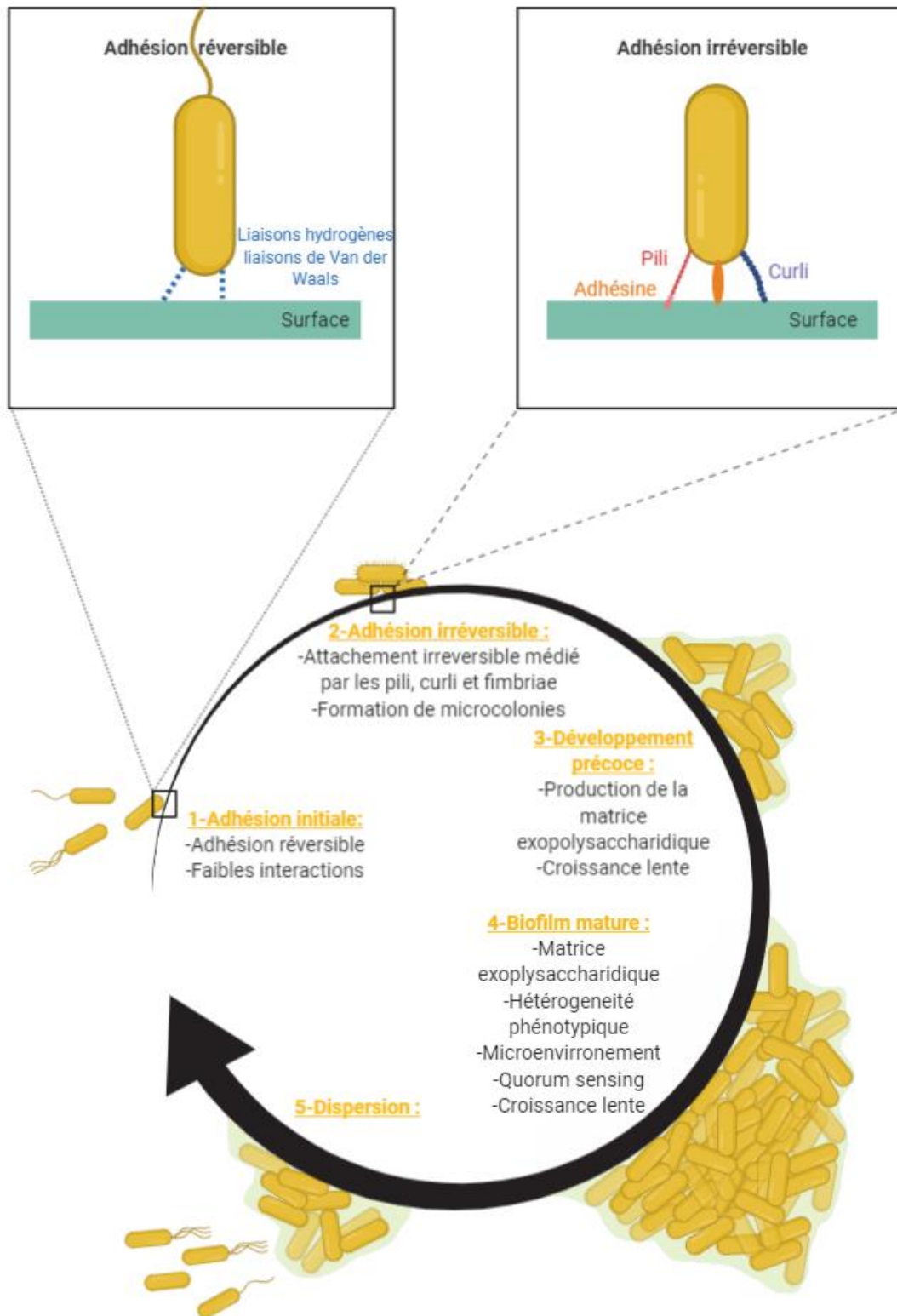


Figure 34 - Cycle de vie d'un biofilm bactérien. Étape 1, adhésion initiale médiée par des liaisons hydrogènes ou de Van der Waals. Étape 2, adhésion irréversible à l'aide d'adhésine, *curli* et *pili*. Étape 3, formation de microcolonies, ralentissement de la croissance et production de matrice extracellulaire. Étape 4, maturation du biofilm. Étape 5, dispersion du biofilm et colonisation d'une nouvelle niche.

OmpR peut, par ailleurs, agir directement sur *csgD* en favorisant sa transcription. OmrA et OmrB régulent également indirectement CsgD en interférant avec la transcription de YdaM et en inhibant l'expression de OmpR (Guillier et Gottesman 2008). GcvB intervient également dans la régulation négative de CsgD en réponse à un apport élevé en acide aminé (Urbanowski, Stauffer, et Stauffer 2000). CsgD contrôle un régulon de 13 gènes. Parmi eux, CsgD régule positivement irP qui intervient dans la stabilisation de RpoS permettant ainsi une boucle de régulation positive sur l'expression de CsgD. CsgD réprime, à l'inverse, les gènes *fliE* et *fliF* impliqués dans la formation du flagelle. CsgD et l'inhibition du ci-di-GMP permettent l'expression des curli via l'opéron *csgBAC* et la production de cellulose via *AdrA*, *YaiC* et *BcsA* (Ogasawara, Yamamoto, et Ishihama 2011; Zogaj et al. 2001).

3 Cycle de vie du biofilm

Le passage du mode de vie planctonique à celui de biofilm fait intervenir plusieurs étapes. Les bactéries interagissent tout d'abord avec un substrat auxquelles elles vont se fixer de façon réversible (étape 1) puis de façon irréversible via des molécules d'adhésion (étape 2). Elles forment ensuite des microcolonies (étape 3) qui mûrent en macrocolonies (étape 4) tout en synthétisant la matrice extracellulaire. L'étape finale est le détachement ou désassemblage pour revenir à la forme planctonique (étape 5) (**Figure 34**). Chaque étape nécessite une reprogrammation de l'expression génique répondant au besoin de protéines spécifiques (Jamal et al. 2018; Tolker-Nielsen 2015; Toyofuku et al. 2016).

3-1 Attachement

L'attachement peut s'effectuer de manière aléatoire ou de manière dirigée par un chimiotactisme ou une mobilité dépendante du flagelle. La bactérie s'attache dans un premier temps de manière réversible à une surface biotique ou abiotique sous l'influence du pH, de la force ionique ou de la température du milieu (Beloin, Roux, et Ghigo 2008). L'attachement réversible se fait par l'intermédiaire de liaisons hydrogène ou de liaisons de Van der Waals qui permettent des interactions de faibles énergies (W. M. Dunne 2002).

Cette phase est très courte, les forces d'adhésion augmentent rapidement entre les bactéries et la surface (Jamal et al. 2018). L'attachement devient ensuite irréversible grâce à des interactions moléculaires et cellulaires spécifiques qui requièrent la production des pilis, curli et fimbriae. Le flagelle qui a pu servir auparavant au déplacement vers la surface de fixation est perdu à cette étape (Prigent-Combaret et al. 2000; Vidal et al. 1998) (**Figure 34**).

3-2 Prolifération et maturation

Une fois fixées, les bactéries colonisent la surface formant des microcolonies et synthétisent les polymères de la matrice extracellulaire permettant la formation de structures tridimensionnelles qui peuvent prendre différentes formes en fonction de l'organisme (champignon, cône ou plat notamment). La présence de la matrice permet la création de microenvironnements au sein du biofilm. Les structures adoptées permettent la création de vides interstitiels entre les bactéries permettant le passage d'eau, de nutriments et de déchets au sein de la communauté. La distribution des nutriments et de l'oxygène est hétérogène induisant une expression différenciée des gènes et entraînant une diversité phénotypique de la population au sein même du biofilm. La maturation du biofilm s'orchestre entre les bactéries en communiquant entre elles par l'intermédiaire du quorum sensing.

3-3 Dispersion

Lorsque le biofilm a atteint le stade final de la maturation, la couche la plus externe se détache du biofilm pour retourner à l'état planctonique. La dispersion peut être influencée par des signaux physiologiques et environnementaux. Elle n'est pas nécessairement mise en place pour fuir un environnement jugé défavorable, mais elle peut à l'inverse intervenir dans des conditions favorables pour les bactéries et être enclenchée dans l'objectif de coloniser une nouvelle niche. Elle peut être active ou passive. Si elle est active, elle est initiée par les bactéries elles-mêmes par modification de leur expression génique. Elles peuvent pour certaines à cette étape exprimer de nouveau leur flagelle et produire des enzymes saccharolytiques qui contribuent au détachement des bactéries de la matrice (Sutherland

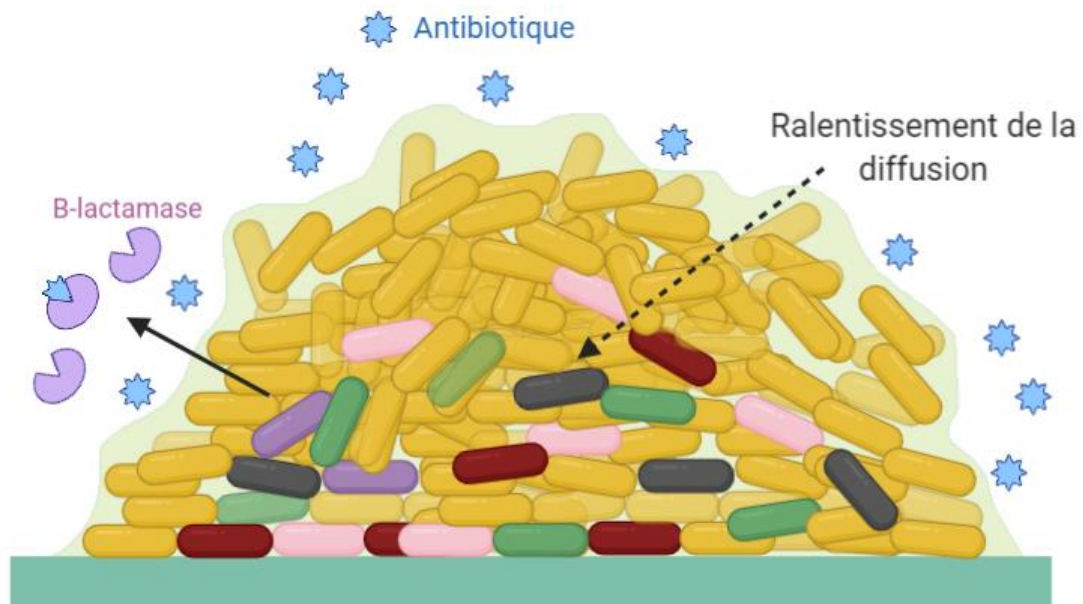
1999). Si elle est passive, elle peut être le résultat de forces mécaniques ou chimiques externe aux biofilms.

4 Quorum sensing

Le quorum sensing est une forme de communication de cellule à cellule qui définit des processus particuliers liés à la densité cellulaire. Le quorum sensing s'effectue grâce à la sécrétion d'auto-inducteurs ou phéromones qui sont des molécules de signalisations (Jamal et al. 2018). Il existe trois familles d'auto-inducteurs qui sont les N-acyl homosérine (AI-1) pour les bactéries Gram négatives, les oligopeptides (AIPs) pour les bactéries Gram positives et les composés à base de 4.5-dihydroxy-2,3-pentanedione (AI-2) pour les bactéries Gram négatives et positives. Ces molécules de signalisation vont diffuser pour interagir avec des capteurs permettant ensuite la modulation de la transcription de façon coordonnée au sein du biofilm influençant son architecture (Y.-H. Li et Tian 2012). Chez les biofilms de *P. aeruginosa* la production de 3-oxododécanyl-HSL, la molécule inductrice du quorum sensing, permet la formation d'un biofilm structuré. Les mutants pour cette molécule présentent des biofilms minces en comparaison à la souche sauvage (Marques, Davies, et Sauer 2015). L'acide cis-décénoïque, produit également par *P. aeruginosa* est un acide gras impliqué dans le quorum sensing contrôlant la formation de biofilm, il induit sa dispersion et module la population de bactéries en persistance en augmentant l'activité métabolique bactérienne (Davies et Marques 2009; Marques, Davies, et Sauer 2015). L'acide cis-décénoïque a une activité interspécifique sur de nombreux biofilms impliquant des bactéries Gram positive ou Gram négative et notamment *E. coli*.

5 Adaptabilité des biofilms face à un stress

Les biofilms confèrent une protection aux bactéries face à un environnement hostile tel que la présence d'une immunité de l'hôte, d'un agent antimicrobien (antibiotiques, désinfectant) ou d'une carence en nutriment (Donlan et Costerton 2002; Sharahi et al. 2019). La plupart des infections liées à la présence de biofilm sont résistantes aux antimicrobiens conventionnels. Pour permettre leur efficacité, les antibiotiques doivent atteindre leur cible et s'accumuler en quantité suffisante. La matrice extracellulaire composée de polymères forme une barrière, les exopolysaccharides chargés négativement agissent comme une



- Persistant
- Synthèse de pompe à efflux
- Changement phénotypique
- Mutant
- Synthèse d'enzymes ciblant les antibiotiques

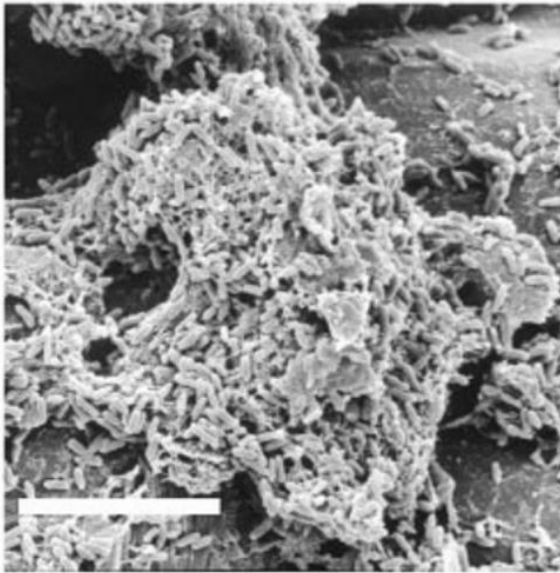
Figure 35 - Mécanisme de tolérance aux antibiotiques des biofilms. La matrice exo-polysaccharidique agit comme une barrière contre les antibiotiques et ralentit leur diffusion. Cette diffusion lente permet l'adaptation phénotypique des bactéries aux stress, la création de persistants, de mutants résistants aux antibiotiques et la mise en place de mécanismes de tolérance tels que la sécrétion de pompes à efflux ou d'enzymes inactivant les antibiotiques comme les β -lactamases.

résine échangeuse d'ions capable de se lier à un grand nombre d'antibiotiques ralentissant leur diffusion (**Figure 35**). Le ralentissement de la diffusion permet l'adaptation métabolique ou transcriptionnelle des bactéries au sein du biofilm. Ainsi certaines bactéries activent l'expression des pompes à efflux ayant pour objectif d'évacuer rapidement les antibiotiques empêchant leur accumulation (Levy 1992; Ross et al. 1990; Kvist, Hancock, et Klemm 2008). C'est le cas pour *E. coli* qui possèdent plusieurs systèmes de pompes à efflux tel que AcrB, lié à la protéine membranaire TolC à l'aide de protéine périplasmique AcrA dont l'expression est induite en condition de stress et qui participe à la résistance aux antibiotiques (Bay et al. 2017; D. Ma et al. 1995). L'action des antibiotiques peut être altérée également par la production d'enzymes, par exemple, la β -lactamase produite par *P. aeruginosa* qui s'accumulent en quantité suffisante au sein du biofilm pour empêcher l'action des antibiotiques. De plus, la faible concentration en oxygène et le pH bas associé aux biofilms altèrent l'effet de certains antibiotiques comme la tobramycine ou la cirpofloxacine (Walters et al. 2003).

Les biofilms sont des écosystèmes où la tolérance aux antibiotiques est fréquente (Jolivet-Gougeon et Bonnaure-Mallet 2014). Plusieurs paramètres orientent les bactéries vers cet état de tolérance : i) les bactéries associées au biofilm ont un temps de génération plus long que celles sous forme planctonique (Desai et al. 1998; Amorena et al. 1999; Duguid et al. 1992) ; ii) la présence d'antibiotique en concentration sous inhibitrice ; iii) l'hétérogénéité métabolique due aux variations micro environnementales au sein même du biofilm. Ces éléments peuvent entraîner l'apparition de bactéries en persistance tolérant les antibiotiques. La présence de bactéries en persistance au sein d'un biofilm pourrait expliquer la réémergence des infections chroniques traitées par antibiothérapie. Cette prédisposition à tolérer les stress (antibiotiques ou chimiques) s'illustre par la forte induction du régulon RpoS dans les biofilms des bactéries à Gram négatif (Adams et McLean 1999; Latifi et al. 1996) .

En plus de cette réduction à la sensibilité aux antibiotiques, les biofilms peuvent échapper aux défenses mises en place par son hôte. Chez *S. pneumoniae*, le passage au mode de vie biofilm lui permet d'exprimer de nombreuses protéines impliquées dans l'attachement, la résistance et la virulence (notamment la pneumolysine, la méthionine sulfoxyde réductase, la pyruvate oxydase et l'UDP-glucose déshydrogénase) (Allegrucci et al. 2006).

A



B

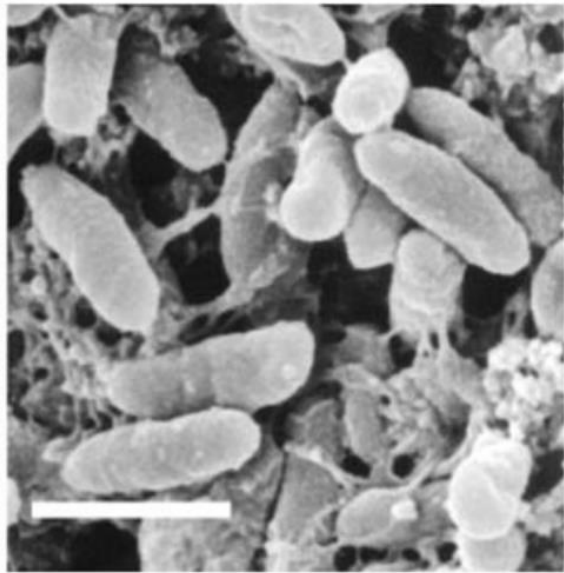


Figure 36 - Microscopie électronique à balayage d'un biofilm de *P. aeruginosa* à la surface d'un galet de granit. A. Barre d'échelle, 10 μm . B. Barre d'échelle, 1 μm (Whiteley et al. 2001).

6 Les Biofilms lors de l'infection

Les biofilms sont fréquemment la cause d'infection bactérienne chez l'homme. Les processus infectieux impliquant des biofilms sont fréquemment des vaginites bactériennes, des infections des voies urinaires, des infections associées aux cathéters, l'otite moyenne, la gingivite, le revêtement de lentilles de contact et la fibrose kystique (Costerton, Stewart, et Greenberg 1999; Lebeaux, Ghigo, et Beloin 2014; Parsek et Singh 2003). Chez les agents pathogènes, les deux modes de vie bactériens peuvent produire des facteurs de virulence différents et conduire à des stratégies d'infection variées. Chez *P. aeruginosa*, par exemple, les voies de régulation coordonnant l'expression de facteurs de virulences nécessaires lors de l'infection aiguë répriment en parallèle les voies impliquées dans la formation de biofilm permettant une grande adaptabilité phénotypique face aux stress environnementaux (Goodman et al. 2004). Chez la plupart des pathogènes, les cellules planctoniques sont souvent à l'origine d'infections aiguës fulminantes, à l'inverse la formation d'un biofilm est souvent corrélée aux infections chroniques profondes et à l'échappement du ciblage par les anticorps, la résistance à la phagocytose et aux agents antimicrobiens (Hall-Stoodley, Costerton, et Stoodley 2004, Vuong et al. 2004; Leid et al. 2005; Cerca et al. 2006). Quatre critères ont été définis pour déterminer les biofilms comme cause d'une infection ; les bactéries doivent être associées à une surface ou adhérentes à un substrat, enfermées dans une matrice, l'infection doit être localisée et résister à l'antibiothérapie alors que les bactéries sous forme planctoniques sont-elles sensibles aux antibiotiques (Parsek et Singh 2003).

6-1 Biofilm de *P. aeruginosa* et infection

P. aeruginosa est un bacille Gram négatif, aérobie strict, ubiquitaire dans l'environnement et longtemps étudié *in vitro* comme modèle de formation de biofilm bactérien. *P. aeruginosa* est également un pathogène opportuniste capable de coloniser les plantes et les hôtes mammifères, il est la cause majeure d'infections nosocomiales due au développement de biofilm sur les tissus ou les implants des patients. Il est notamment retrouvé dans les poumons des patients atteints de fibrose kystique (Palmer, Aye, et Whiteley 2007).

6-1-1 Formation du biofilm de *P.aeruginosa*

Les composants clefs du biofilm de *P.aeruginosa* sont les exopolysaccharides, l'ADN extracellulaire, les lipides, les protéines et les pili de type IV permettant la fixation aux surfaces et jouant un rôle structural au sein du biofilm mûre (**Figure 36**). La spécificité du biofilm de *P.aeruginosa* vient des principaux exopolysaccharides produits par la bactérie qui sont l'alginate, le Pel et le Psl. L'alginate est un polymère linéaire non ramifié composé d'acide D-mannuronique et d'acide L-gulonique il permet la stabilité, la protection et la rétention d'eau et de nutriments dans le biofilm. Le polysaccharide Pel est riche en glucose et le Psl comprend un pentasaccharide récurrent constitué de D-mannose, de L-rhamnose et de D-glucose. Le Pel et Psl peuvent servir d'échafaudage pour le développement des premiers stades du biofilm (L. Ma et al. 2012; Colvin et al. 2011; Franklin et al. 2011). Le changement de mode de vie motile à sessile passe par une augmentation de trois à cinq fois du second messager ci-di-GMP (Valentini et Filloux 2016). La production s'enclenche lors de la fixation de la bactérie à une surface, des signaux chimiques comme des signaux de détection de quorum sensing et d'autres signaux encore inconnus sont captés par la bactérie. De plus, les contacts physiques peuvent provoquer un stress de la paroi bactérienne entraînant la rétraction des pili de type IV et permettant l'activation des voies de formation de biofilm. Les taux élevés de ci-di-GMP intracellulaire active l'expression de deux opérons de pompes à efflux *mexAB-oprM* et *mexEF-oprN* permettant une résistance accrue aux antibiotiques au stade initial de la formation du biofilm (Gupta et al. 2014; Liao, Schurr, et Sauer 2013).

6-1-2 Captation du fer pour la formation de biofilm par *P. aeruginosa*

Lors d'une infection par *P.aeruginosa*, les lactoferrines présents dans le sang et agissant comme chélateur du Fer limitent la maturation des biofilms formés par la bactérie (Singh et al. 2002). *P.aeruginosa* possède deux systèmes d'acquisition du fer, le système pyoverdine de haute affinité et pyochéline de plus faible affinité. Les deux systèmes se lient au fer extracellulaire qui sera ensuite transporté dans la bactérie qui est un prérequis pour permettre la formation de biofilm structuré. *In vitro*, la concentration en fer cytoplasmique constitue un signal pour la formation de biofilm structuré en forme de champignon, en

l'absence de système de captation du fer *P.aeruginosa* forme des biofilms fins et plats (Banin, Vasil, et Greenberg 2005). De plus il a été démontré *in vitro*, chez cette bactérie, qu'un faible niveau en fer favoriserait la mobilité exploratrice et empêcherait l'étape d'adhésion à la surface (Singh et al. 2002).

6-1-3 Échappement de *P. aeruginosa* aux défenses immunitaires

P.aeruginosa lors de son passage au mode de vie biofilm produit de façon accrue des rhamnolipides. Les rhamnolipides sont des glycolipides possédant des propriétés des biosurfactants, leur expression est activée par le quorum sensing et la présence des neutrophiles (**Figure 37**) (Johnson et Boese-Marrazzo 1980; Jensen et al. 2007). Ils peuvent provoquer une nécrose cellulaire et l'élimination des neutrophiles. (Alhede et al. 2014; Andersen et al. 2017; Van Gennip et al. 2009). Par ailleurs, les neutrophiles nécrotiques améliorent le développement du biofilm de *P. aeruginosa*, les bactéries peuvent se fixer aux polymères d'actine et d'ADN libérés par les neutrophiles lors de la nécrose (Walker et al. 2005). Le biofilm de *P. aeruginosa* est capable également d'inactiver directement le complément. De plus, alginate O-acétylé, un des composants la matrice, empêche l'activation de la voie alternative du complément permettant la protection des bactéries contre de la phagocytose indépendante des anticorps. Chez les patients atteints de fibrose kystique, la matrice du biofilm produit par *P. aeruginosa* médie le basculement de la réponse M1/M2 vers la réponse M2 favorisant une réponse anti-inflammatoire et un milieu immunosupresseur favorable à la survie des biofilms (Moser et al. 2000; Bielen et al. 2017).

6-2 Biofilm des UPEC et infections intracellulaires

Les *E. coli* pathogènes extra- intestinaux (ExPEC) sont à l'origine de nombreuses maladies, parmi elles les Escherichia coli uropathogènes (UPEC) sont impliqués dans 90% des infections urinaires diagnostiquées (Betsy Foxman 2003). Les infections des voies urinaires humaines comptent parmi les infections bactériennes les plus courantes (Hunstad et Justice 2010). Ces infections se propagent rarement au-delà des voies urinaires, mais elles ont tendance à

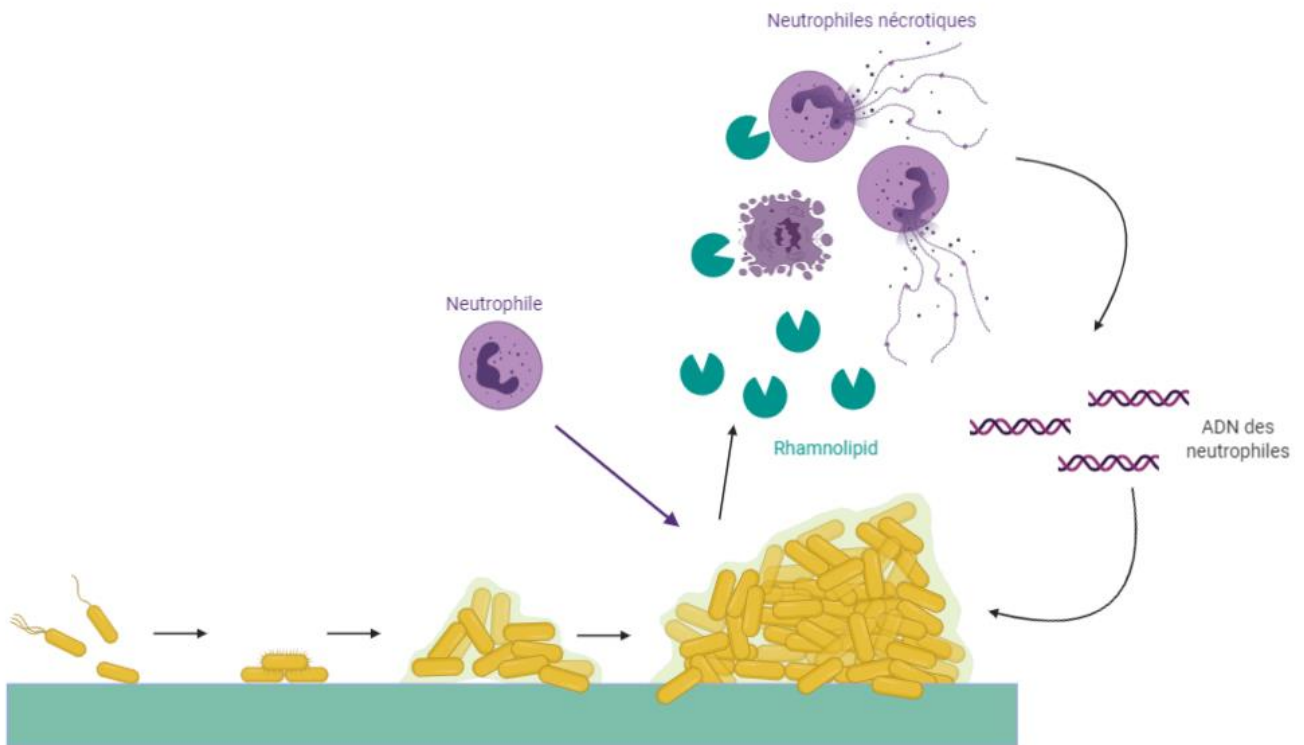


Figure 37 - Cycle de lyse nécrotique des neutrophiles dans les infections par biofilms de *P.aeruginosa*. L'arrivée des neutrophiles induit un signal dans le biofilm de *P.aeruginosa* qui produit des rhamnolipid induisant la nécrose des neutrophiles. L'ADN libéré par les neutrophiles sert ensuite à consolider le biofilm. Figure adaptée de (Alhede et al. 2014)

persister dans le temps. Un quart des femmes ayant eu une infection urinaire déclareront une seconde infection dans les 6 mois suivant la primo-infection. Les infections sont ensuite récurrentes tout au long de la vie (Mulvey, Schilling, et Hultgren 2001; Hooton et Stamm 1997). Les bactéries responsables des infections urinaires récurrentes sont souvent identiques phénotypiquement et génotypiquement à la souche bactérienne ayant provoqué la primo-infection (Jacobson, Kühn, et Brauner 1992; B. Foxman et al. 1995; Brauner, Jacobson, et Kühn 1992).

6-2-1 Biofilm intracellulaire formé par les UPEC

Lors d'une infection urinaire causée par la présence d'UPEC, les bactéries envahissent les cellules épithéliales et se divisent rapidement, à la suite de cette première étape on observe un switch phénotypique entraînant la création d'une communauté bactérienne appelée IBC (intracellular bacterial communities) aboutissant à la formation d'un biofilm intracellulaire (**Figure 38**). Les bactéries se détachent ensuite du biofilm pour se disperser dans la lumière de la vessie et se lier de nouveau à l'épithélium pour engager un nouveau cycle infectieux. La formation de biofilm permet aux UPEC de résister aux défenses de l'hôte et de persister dans les voies urinaires (Gunther et al. 2002). Les infections urinaires récurrentes pourraient se produire par résurgence de la bactérie d'un réservoir de dormantes au sein de la vessie.

6-2-2 Adhésion des UPEC aux cellules épithéliales

L'épithélium de la vessie est composé d'une couche de cellules superficielles hautement différenciée surmontant trois couches de cellules épithéliales basales plus petites et indifférenciées appelées cellules de transitions (**Figure 38**). Une infection de cette couche épithéliale peut entraîner la production de cytokines pro inflammatoires activant un processus d'exfoliation de la couche épithéliale superficielle. C'est un mécanisme qui rappelle l'apoptose et qui est très efficace pour l'élimination des pathogènes. Malgré la réponse inflammatoire et l'exfoliation de la couche superficielle de cellules épithéliales, les UPEC sont capables de se maintenir dans la vessie pendant plusieurs jours voir plusieurs mois (Anderson et al. 2003a). Les UPEC colonisent cette couche supérieure sans provoquer

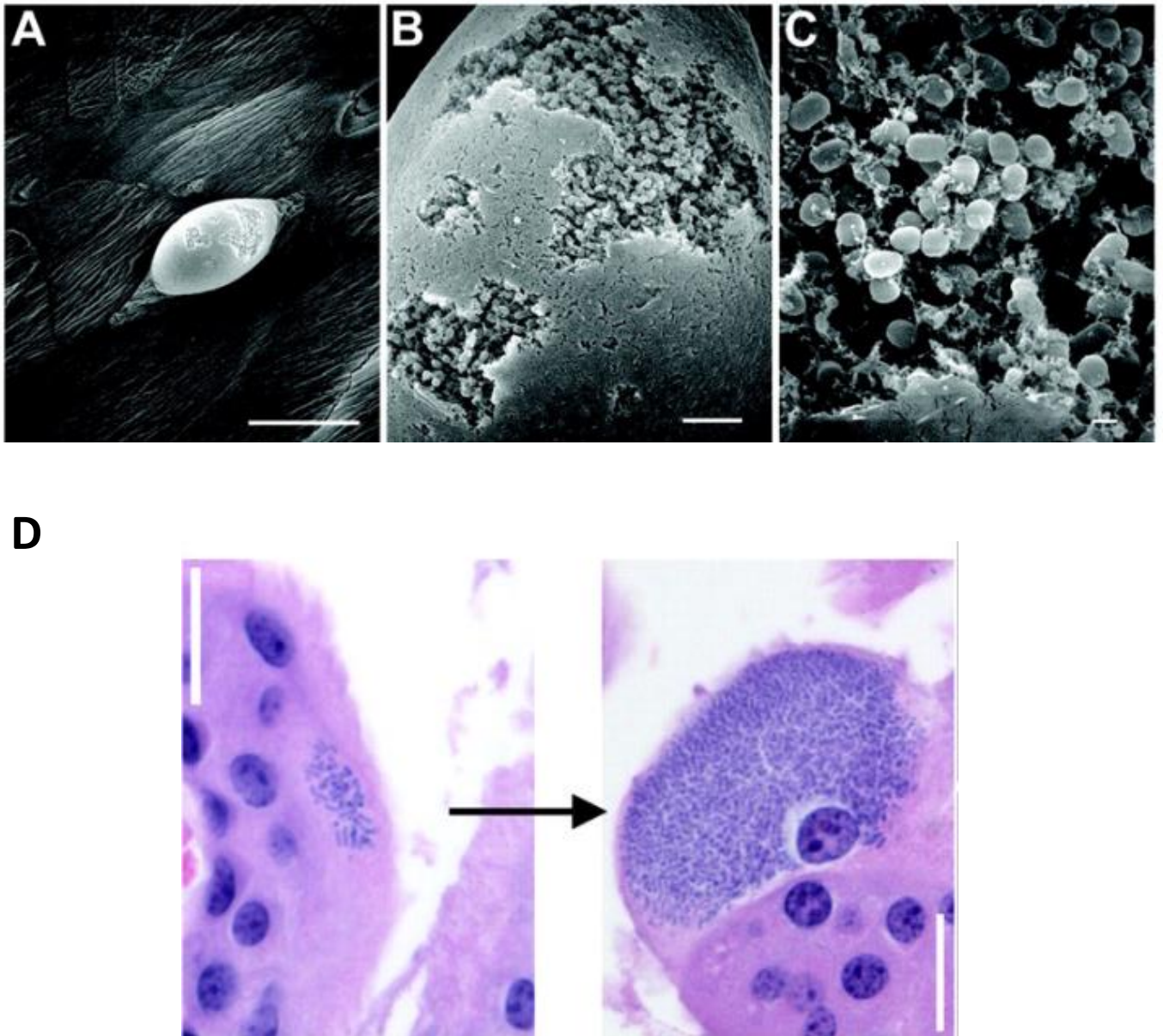


Figure 38 - Formation de biofilm intracellulaire dans les cellules de la vessie. A à C- Visualisation au microscope électronique à balayage de la surface des cellules épithéliales de la vessie de souris C3H/HeJ infectées par UT189 pendant 24h. On voit la formation d'une bosse à la surface de la vessie contenant une grande quantité de bactéries intracellulaires formant une grosse colonie compacte. Barres d'échelle, 50 μ m (A), 5 μ m (B), 0.5 μ m (C). (D) Coupes de vessie de souris C3H/HeJ infectées par UT189 puis colorées par H & E . Observation en microscope optique 6h après inoculation puis 24h après infection montrant la formation d'une large communauté compacte dans le cytoplasme des cellules (Anderson et al. 2003a).

l'exfoliation immédiate (Mulvey, Schilling, et Hultgren 2001). La fixation des UPEC à l'épithélium de la vessie se fait via l'intermédiaire de l'adhésine FimH des pili de type 1 aux protéines de membranes appelées uroplakines servant de récepteurs (Wu, Sun, et Medina 1996). Cette adhérence est activée par les forces de cisaillement rencontrées dans la vessie (Thomas et al. 2002). Les UPEC envahissent ensuite les cellules épithéliales, la liaison via FimH entraîne une cascade de signalisations permettant le remodelage de l'actine des cellules épithéliales et la phagocytose des bactéries (Martinez et Hultgren 2002).

6-2-3 Multiplication intracellulaire des UPEC

Dans les cellules épithéliales, les UPEC se divisent rapidement pour former des foyers de bactéries appelées IBC (Justice et al. 2004). Durant cette phase les UPEC ont une morphologie standard en bâtonnet d'une longueur moyenne de 3 μ m, les bactéries se divisent rapidement avec un temps de doublement moyen de 30 min (Justice et al. 2004). Après approximativement 6 à 8h d'infection les premiers foyers infectieux d'UPEC subissent un changement phénotypique drastique. La vitesse de croissance chute pour un temps de doublement supérieur à 60min, la longueur des bactéries diminue pour atteindre en moyenne 0.7 μ m et elles prennent une forme coccoïde. Les bactéries libres dans le cytoplasme se regroupent à ce stade en sphères compactes et occupent une grande partie du cytoplasme induisant une déformation des cellules épithéliales infectées. Cette phase constitue le stade moyen de la maturation de la communauté d'UPEC qui présente alors de nombreuses propriétés associées aux biofilms, comme la production d'une matrice exopolysaccharide (Anderson et al. 2003a) (**Figure 39**).

6-2-4 Échappement des UPEC

La maturation se termine environ 12h après l'infection, les bactéries situées à la périphérie du biofilm intracellulaire retrouvent une forme bacillaire d'environ 2 μ m, une partie d'entre elles filamentent. Elles deviennent très mobiles et se détachent pour atteindre le bord de la cellule et être libérées dans la lumière de la vessie se propageant de nouveau dans l'épithélium (Justice et al. 2004).

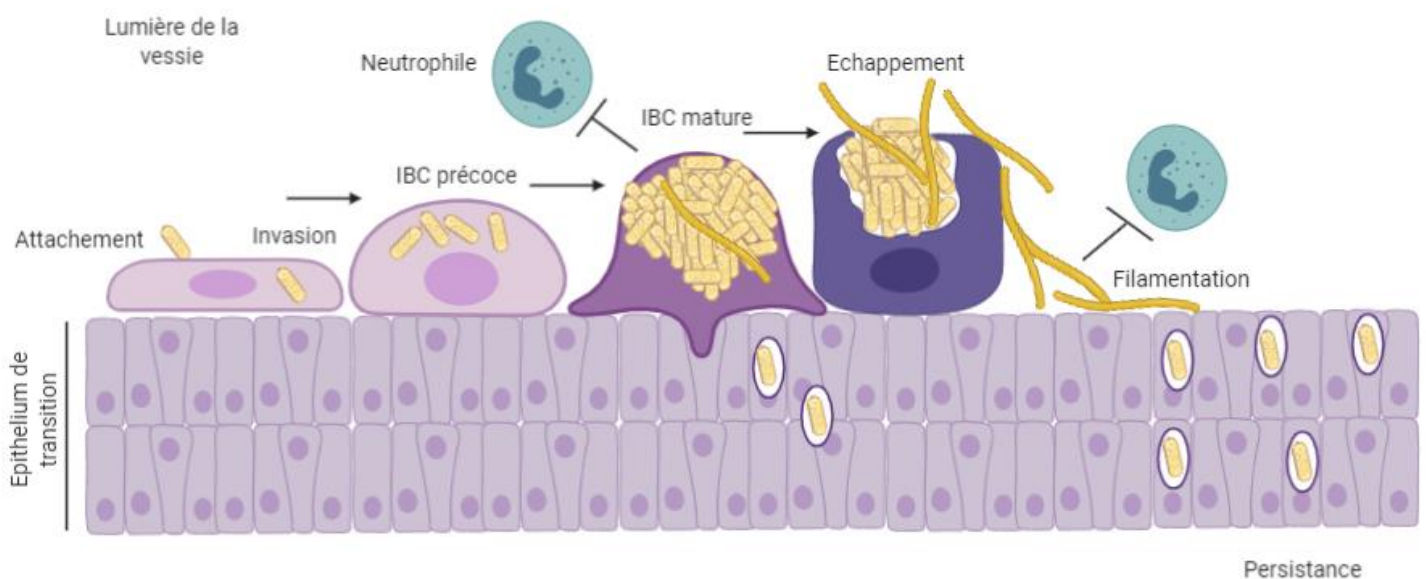


Figure 39 - Cycle infectieux des UPEC dans les cellules épithéliales de la vessie. Les UPEC adhèrent à la couche superficielle des cellules épithéliales de la vessie *via* leur pilus de type I induisant leur phagocytose. Après l'entrée, les bactéries forment dans le cytoplasme de la cellule les premiers foyers qui vont très rapidement mûrir pour former de larges foyers remplissant la totalité du cytoplasme de la cellule infectée. Les neutrophiles ne peuvent pas éliminer les bactéries à ce stade, mais les cellules peuvent être exfoliées. Après maturation du foyer les bactéries se libèrent, certaines ont filamenté, ce phénotype leur permet d'échapper à la phagocytose. Un nouveau cycle peut être initié. L'exfoliation de certaines cellules de la couche superficielle a donné accès aux bactéries aux cellules de transition. Les UPEC infectant ces cellules restent dans un compartiment associé à la membrane et ne se divisent plus ou très peu, elles pourraient être en persistance et être responsable de la chronicité de la maladie.

L'échappement de la cellule épithéliale débute avec quelques bactéries, puis l'altération de la membrane épithéliale de la cellule due à la fuite des bactéries entraîne l'explosion et la libération de toute la communauté intracellulaire. Un foyer mûre contient environ 10^5 bactéries. Certaines bactéries s'échappant aux derniers stades peuvent filamenter et atteindre une longueur pouvant aller jusqu'à $70\mu\text{m}$. La filamentation des UPEC leur permet de rester en contact avec l'épithélium et d'interagir avec les cellules épithéliales voisines de la vessie lorsqu'elles quittent leur cellule hôte (Mulvey, Schilling, et Hultgren 2001). Lors de l'initiation d'un second cycle d'infection intracellulaire, le temps de formation de la communauté intracellulaire est beaucoup plus long avec un temps de division supérieur à 60 min dès le début de l'infection. Après la répétition de plusieurs cycles infectieux, les cellules de la couche supérieure infectées par les UPEC sont exfoliées, ceci permet aux bactéries d'accéder aux cellules plus internes et permet la création de réservoirs de bactéries composés exclusivement de bactéries en dormance (Justice et al. 2004; Mulvey, Schilling, et Hultgren 2001; Hvidberg et al. 2000). Les UPEC dans ces cellules de transitions restent dans un compartiment apparenté aux endosomes tardifs, ne se multiplient plus ou peu et peuvent persister ainsi plusieurs jours. Des dénombrements bactériens dans l'urine de souris infectées montre la présence de bactéries encore 28 jours après l'inoculation (Mysorekar et Hultgren 2006; Hunstad et Justice 2010). Périodiquement il peut y avoir une réactivation du cycle infectieux (**Figure 40**).

6-2-5 Implication du fer dans la formation des biofilms d'UPEC

La présence de fer influence l'architecture des biofilms d'UPEC *in vitro* et permet une résistance des bactéries au stress H_2O_2 (DePas et al. 2013). Au cours de l'infection des voies urinaires par la souche UPEC CFT073 son transcriptome a révélé une surexpression de cinq systèmes d'acquisitions du fer. La croissance de cette souche dans de l'urine humaine a montré les mêmes résultats (Snyder et al. 2004). L'implication de la capture du fer dans la survie des UPEC intracellulaires est également illustrée par la surexpression de *ChuA*, un système d'acquisition du fer. La délétion de *chuA* impacte la taille des foyers de multiplication intracellulaires, plus petits comparée à ceux formés avec la souche sauvage. (Reigstad, Hultgren, et Gordon 2007).

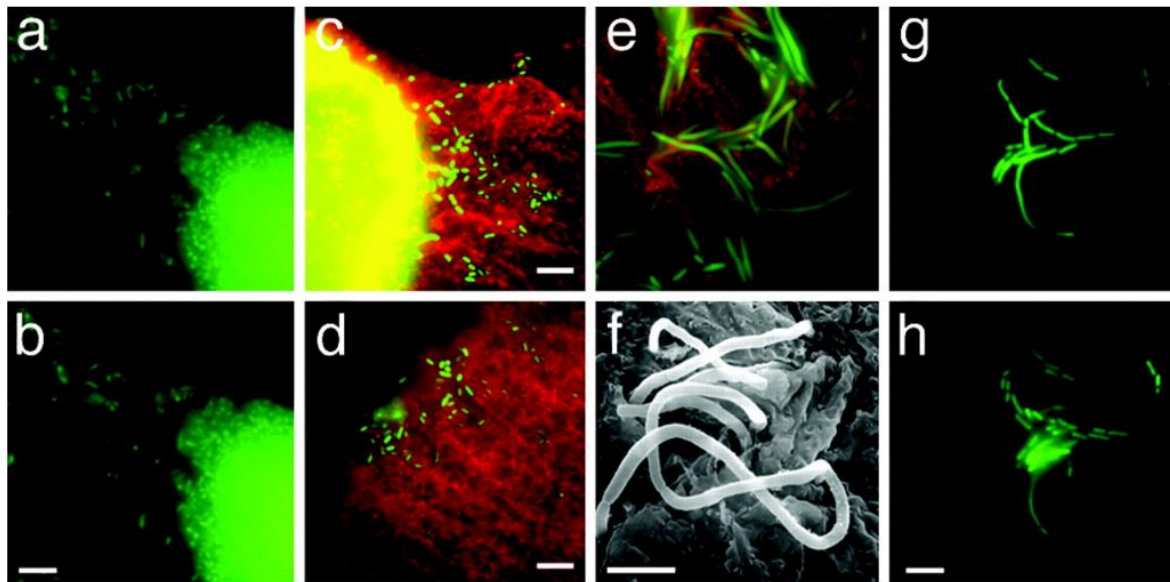


Figure 40 - Échappement des UPEC des cellules épithéliales. a et b) Échappement des bactéries, les deux images ont été prises à 3 secondes d'intervalle, les bactéries qui se détachent sont très mobiles. c et d) Échappement des bactéries (en vert) des cellules épithéliales (en rouge) e) Bactéries filamenteuses à la surface de la vessie f) même observation en microscopie électronique à balayage. g et h) Les bactéries filamenteuses libérées se remettent en croissance, les images g et h ont été prises à 36min d'intervalle. Barres d'échelle = 10μm sur l'image b, d et h et 5μm pour l'image f. (Justice et al. 2004)

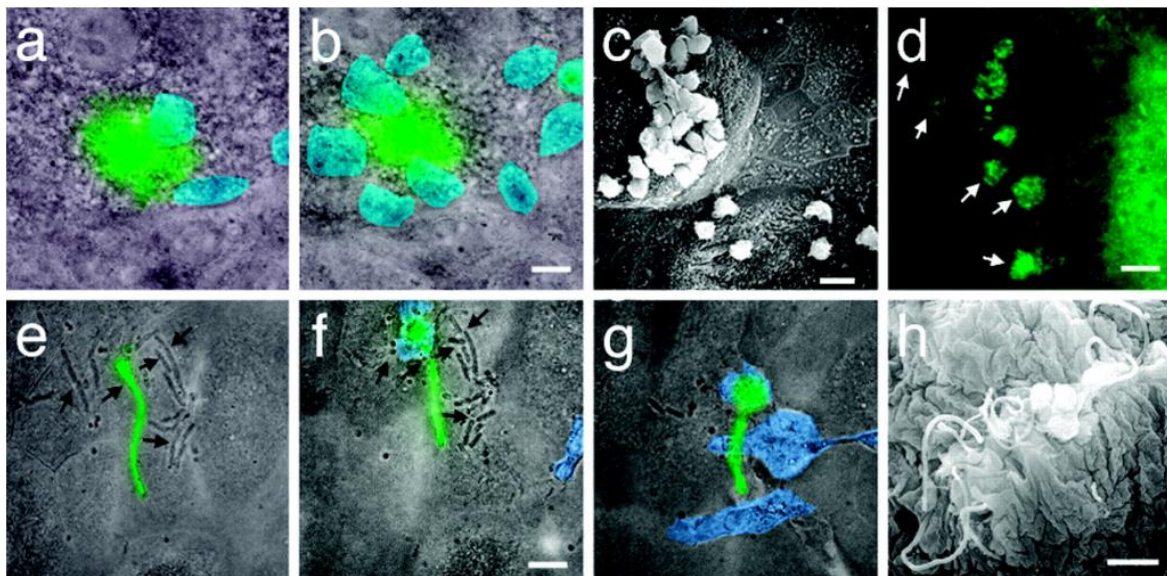


Figure 41 - La filamentation des UPEC au cours du processus infectieux les protège contre les attaques des neutrophiles. les images de microscopie à fluorescence ont été superposées avec une image en lumière transmise prise simultanément. Les neutrophiles sont en bleu. a) Epifluorescence de l'IBC mature dans la cellule observée en vert tandis que les neutrophiles se regroupent à la surface. b) Dix minutes plus tard, d'avantage de neutrophiles ont été recrutés à la surface des cellules infectées, mais sont absents à la surface des cellules non infectées. c) Microscopie électronique de la surface de la vessie montrant de nombreux neutrophiles à la surface des cellules infectées. d) Neutrophile phagocytant les IBC matures (flèches blanches). e-g) Superposition d'images en microscopie à fluorescence montrant les neutrophiles phagocytant les bactéries non fluorescentes en division (flèches noires), mais pas les bactéries en filamentation fluorescentes. Ces images ont été prises à 13 minutes d'intervalle. h) Microscopie électronique de la surface de la vessie montrant que les filaments survivent malgré la présence de neutrophiles. Barre d'échelle = 10μm

6-2-6 Le dimorphisme des UPEC leur permet d'échapper à la phagocytose par les neutrophiles

Les cellules épithéliales lors d'une infection bactérienne reconnaissent le LPS des bactéries via les récepteurs TLR permettant la mise en place d'une réponse pro inflammatoire par production notamment d'IL-6,IL-8 (Mulvey 2002) favorisant le recrutement des neutrophiles dans la vessie en tant que cellules effectrices antibactériennes (Haraoka et al. 1999). Il a été observé, dans le cas d'une infection par les UPEC, une incapacité des neutrophiles à éliminer les foyers bactériens. Les cellules infectées sont reconnues par les neutrophiles, mais ils ne peuvent pas accéder à la population bactérienne se multipliant au sein des cellules. La filamentation des bactéries durant le cycle intracellulaire est favorisée par la réponse inflammatoire dépendante de TLR-4. les filaments permettent l'échappement aux neutrophiles, ils ont été observés entourant les neutrophiles, mais non phagocytés, ce qui confère aux bactéries filamenteuses un avantage pour l'étape de dissémination (**Figure 41**) (Justice et al. 2004). La filamentation est un phénotype qui a été observé également pour d'autres types de bactéries Gram négatives tels que *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* ou *Proteus mirabilis* dans des échantillons d'urine de femmes (Rosen et al. 2007). Il a été montré clairement que la filamentation est un facteur de virulence associé à la persistance lors de cystite. Elle pourrait être le résultat de la réponse SOS enclenchée par les bactéries dont l'ADN est endommagé durant leur processus d'infection (Schoemaker, Gayda, et Markovitz 1984). L'ADN est endommagé, à cause de stress environnementaux, l'induction du gène *suIA* bloque la division cellulaire sans bloquer la croissance ce qui provoque la filamentation et permet d'augmenter la période où la recombinaison homologue est possible pour réparer l'ADN (Janion 2001). Il est à noter que la forme de filament seule ne confère pas de protection aux UPEC, en effet, l'induction de la filamentation par une exposition *in vitro* à la mitomycine C n'a pas suffi à protéger les bactéries de la phagocytose. Néanmoins l'utilisation de mitomycine C entraîne la mort des *E. coli*, il serait intéressant de refaire cette expérience avec une autre drogue induisant la filamentation sans affecter la viabilité des bactéries, tel que la céphalexine. Récemment, il a été observé que la filamentation d'*E. coli* commensales est aussi observée lors de la transition entre aérobie et anaérobie, dans ce cas c'est un petit ARN (*dicF*) qui en est responsable (Murashko et Lin-Chao 2017). Ces observations suggèrent que les bactéries, comme les cellules

eucaryotes, utilisent leur forme comme un mécanisme adaptatif augmentant le fitness lors de changements d'environnements.

6-3 Les biofilms formés par les AIEC

La composition de la flore microbienne de la muqueuse des patients atteints de la MC diffère de celle des individus sains (Wehkamp et al. 2016). La mise en évidence d'une surreprésentation de biofilm associé aux muqueuses des patients atteints de la maladie de Crohn suggère que les AIEC pourraient utiliser leur habilité à former des biofilms comme facteur de virulence dans la colonisation de l'hôte (Swidsinski et al. 2002; 2005). La capacité à former des biofilms dans l'intestin conférerait un avantage de colonisation en augmentant les chances d'envahir l'épithélium intestinal et enclencher une inflammation. Les AIEC démontrent une capacité accrue à la formation de biofilm *in vitro* en comparaison à d'autres souches d'*E. coli* non-AIEC isolées de la muqueuse intestinales. Parmi les AIEC la souche de référence LF82 à une capacité supérieure à former des biofilms *in vitro*. Par ailleurs un mutant LF82 pour le gène *fliC* impliqué dans la formation du flagelle à une capacité affectée pour la formation de biofilm *in vitro* (Martinez-Medina, Naves, et al. 2009).

6-3-1 La colonisation de l'intestin par la bactérie LF82 nécessite la formation de biofilm

6-3-1-1 La protéine BcmA (biofilm coupled to motility A)

Il a récemment été mis en évidence chez la souche LF82 une nouvelle protéine LF82_314 annotée sous le nom de *bcmA* (biofilm coupled to motility A) et conservée parmi les Enterobacteriaceae. Des tests de colonisation de l'intestin de *C. elegans* ont démontré la nécessité de ce gène dans l'étape de colonisation de la muqueuse intestinale. BcmA serait impliqué dans la modulation de la vitesse de la bactérie médiée par la motilité du flagelle et permettrait la transition de l'état mobile à celui de biofilm (Cogger-Ward et al. 2019). La localisation de cette protéine n'a pas encore été clairement définie, elle serait cytoplasmique ou périplasmique.

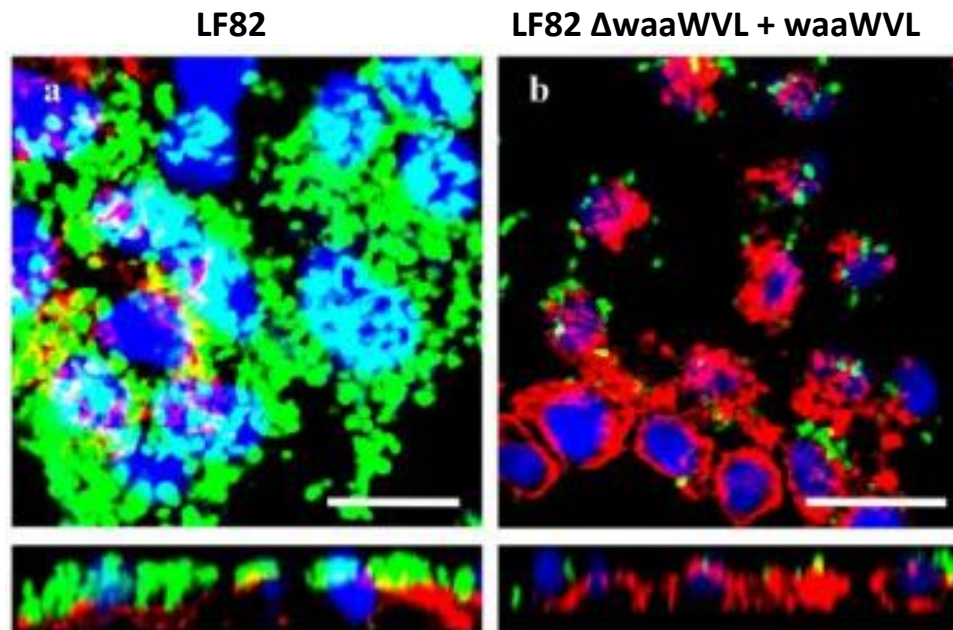


Figure 42 - Implication de l'opéron *waaWVL* dans l'interaction de la souche AIEC avec la muqueuse intestinale. Analyse confocale de la formation de biofilm de la souche LF82 GFP (a) et de la souche LF82 $\Delta waaWVL$ + pBAD24 *waaWVL*-GFP en absence d'arabinose (promoteur non induit)(b) à la surface d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales I-407 fixées à la PFA. L'actine des cellules est marquée en rouge avec la phalloïdine TRITC et les noyaux en bleu avec du Hoescht. Barre d'échelle 50 μ m (Chassaing et Darfeuille-Michaud 2013).

6-3-1-2 L'opéron waaWVL

L'inhibition de la voie RpoE, impliquée dans la réponse aux stress, entraîne une diminution de la capacité de la souche LF82 à former des biofilms *in vitro* ainsi qu'une diminution de la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales (Chassaing et Darfeuille-Michaud 2013). L'étude du régulon RpoE, afin d'identifier des gènes impliqués dans ce phénotype de colonisation de LF82, a révélé que l'opéron waaWVL en est un nouveau membre dans la souche LF82. Cet opéron est impliqué dans la structure et la composition des lipopolysaccharides de LF82 et est essentiel pour la production de biofilm et la colonisation des cellules épithéliales intestinales (**Figure 42**) (Chassaing et Darfeuille-Michaud 2013). L'augmentation de l'osmolarité dans le tractus gastro-intestinal pourrait entraîner une surexpression de la protéine de membrane OmpC activant ainsi la voie de régulation RpoE régulant le pili de type 1 et le flagelle nécessaires à la formation de biofilm et l'adhésion aux cellules épithéliales (Chassaing et Darfeuille-Michaud 2013; Rolhion, Carvalho, et Darfeuille-Michaud 2007).

6-3-2 Rôle du fer dans la formation de biofilm des AIEC

Les biofilms intestinaux présents chez les patients atteints de maladies intestinales inflammatoires comme la MC sont caractérisés par une absorption accrue du fer en comparaison aux biofilms développés chez des individus sains (Motta et al. 2018). Chez les AIEC les gènes codant pour l'utilisation du propanediol et l'acquisition du fer (yersiniabactine, *sitABCD*, *chuABC*) sont surreprésentés en comparaison à d'autres *E. coli* non pathogènes. En accord avec ces observations, la capacité des souches AIEC à utiliser le fer a été démontrée comme nécessaire à la colonisation de l'intestin (Brombacher et al. 2006). Chez la souche AIEC NC101 le fer favorise la formation de biofilm dépendant de la cellulose. Un mutant NC101 pour le gène *bcsA*, impliqué dans la synthèse de cellulose, présente une absorption réduite par les macrophages en comparaison à une souche sauvage. Pour cette souche, la formation de biofilm dépendant de la cellulose et de la présence de fer module les interactions avec les macrophages en améliorant la phagocytose sans pour autant impacter sur sa survie intracellulaire (Ellermann et al. 2015). La colonisation du tractus intestinal de souris par la souche AIEC NC101 déficiente pour la

production de cellulose diminue la réponse immunitaire inflammatoire associée au Th-17 et une diminution d'IL12 produite par les macrophages (Ellermann et al. 2015).

Partie 6 : Formation de persistants pour la survie intracellulaire

1 Définition des bactéries en persistance

Les bactéries en persistance sont définies comme étant une sous population tolérante aux antibiotiques (Kussell et al. 2005). Les cellules en persistance ne se divisent pas ou peu et représentent moins de 1% d'une population en état stationnaire. La tolérance aux antibiotiques est différente de la résistance aux antibiotiques, car elle n'est pas héréditaire (Fisher, Gollan, et Helaine 2017). Les éléments conduisant à la tolérance sont multiples, mais semblent avoir pour point commun une réduction de la croissance et du métabolisme des cellules concernées. En effet, l'activité très faible de synthèse de paroi cellulaire, de traduction ou de réplication de l'ADN et donc des topoisomérases, les cibles respectives des B-lactames, des aminoglycosides et des quinolones, limite la toxicité de ces antibiotiques sur des bactéries dont le métabolisme est réduit. Les bactéries non répliquatives ne sont pas toutes des bactéries en persistance, des conditions bactériostatiques n'entraînent pas nécessairement l'apparition d'une tolérance antibiotique (Orman et Brynildsen 2013).

Le phénomène de persistance est caractérisé par une chute biphasique de la viabilité cellulaire, au cours du temps, d'une culture bactérienne se développant dans un environnement non stressant et exposée soudainement à un antibiotique (**Figure 43**). La majorité de la population est rapidement tuée, une deuxième cinétique plus lente (éventuellement de pente nulle) est observable ensuite, elle correspond à la population de persistants, on parle ici de persistance de type 1. L'apparition de bactéries en persistance au sein d'une population est stochastique, mais peut être induite lorsque la population bactérienne est confrontée à un environnement hostile (Arnoldini et al. 2012, Bernier et al. 2013)). Une concentration sous inhibitrice d'antibiotique ou la présence d'un stress environnemental comme une carence en nutriment, des dommages à l'ADN peuvent augmenter considérablement le nombre de persistants dans la population, on parle alors de persistance induite ou persistance de type 2 (Levin, Concepción-Acevedo, et Udekwu 2014). Les gènes associés à la persistance et plus particulièrement à la persistance induite sont nombreux.

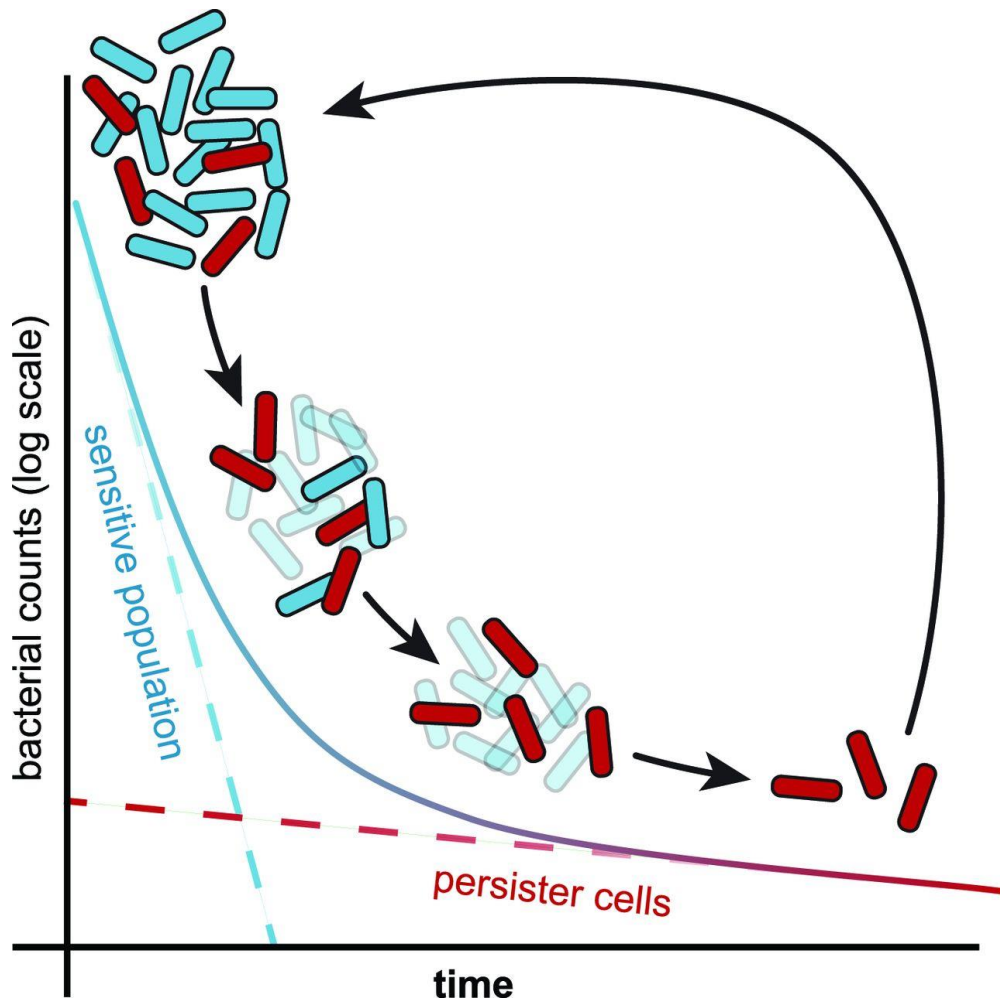


Figure 43 - Cinétique de destruction biphasique due à un traitement antibiotique bactéricide. Une dose létale d'antibiotiques bactéricide ajoutée au temps zéro élimine rapidement la population sensible (bleue) jusqu'à ce qu'il ne reste plus que des cellules persistantes en non croissance (rouge). (Harms, Maisonneuve, et Gerdes 2016)

Toutes les communautés bactériennes sont théoriquement capables de former des persistants, ce phénomène pourrait représenter une stratégie de pérennisation de la bactérie dans un écosystème lui permettant de recoloniser son environnement après un évènement stressant (Lennon et Jones 2011). La formation de persistants dans une population bactérienne participe ainsi à l'adaptation phénotypique des bactéries face à leur environnement. Il a été montré que la persistance vis-à-vis d'un antibiotique peut être un tremplin pour l'apparition de mutations conférant par la suite une résistance. Cela est probablement dû au temps de latence conféré par la tolérance qui permettrait la mise en place des voies de signalisation de stress dont la réponse SOS et au final augmenterait le taux de mutagenèse au sein de la communauté bactérienne (Cohen, Lobritz, et Collins 2013; Van den Bergh et al. 2016)

2 Génétique des persistants

Même si le phénotype de persistance n'est pas héréditaire, l'apparition de persistant s'appuie sur l'expression de certaines voies génétique (Fridman et al. 2014; Levin, Concepción-Acevedo, et Udekwa 2014; Schumacher et al. 2015). Le taux de persistants formé au sein d'une population varie en fonction des espèces et des conditions. Au sein même d'une population de persistants le phénotype peut être hétérogène et leur tolérance aux antibiotiques peut varier (Ronneau et Helaine 2019). Il existe des tolérances différentielles aux stress probablement dues aux mécanismes différents mis en place pour la création de persistants en fonction des bactéries (Amato et Brynildsen 2015; B. Stewart et Rozen 2012; Hofsteenge, van Nimwegen, et Silander 2013). Il a été ainsi observé que des souches d'*E. coli* différentes présentent des variations significatives de leur taux de persistants suite à une exposition à un antibiotique (B. Stewart et Rozen 2012).

2-1 Réponse aux stress

Les bactéries font face à des changements d'environnements constants et peuvent être confrontées à de nombreux stress notamment des carences en carbone, azote ou phosphate, le passage d'une croissance exponentielle à stationnaire qui correspond à

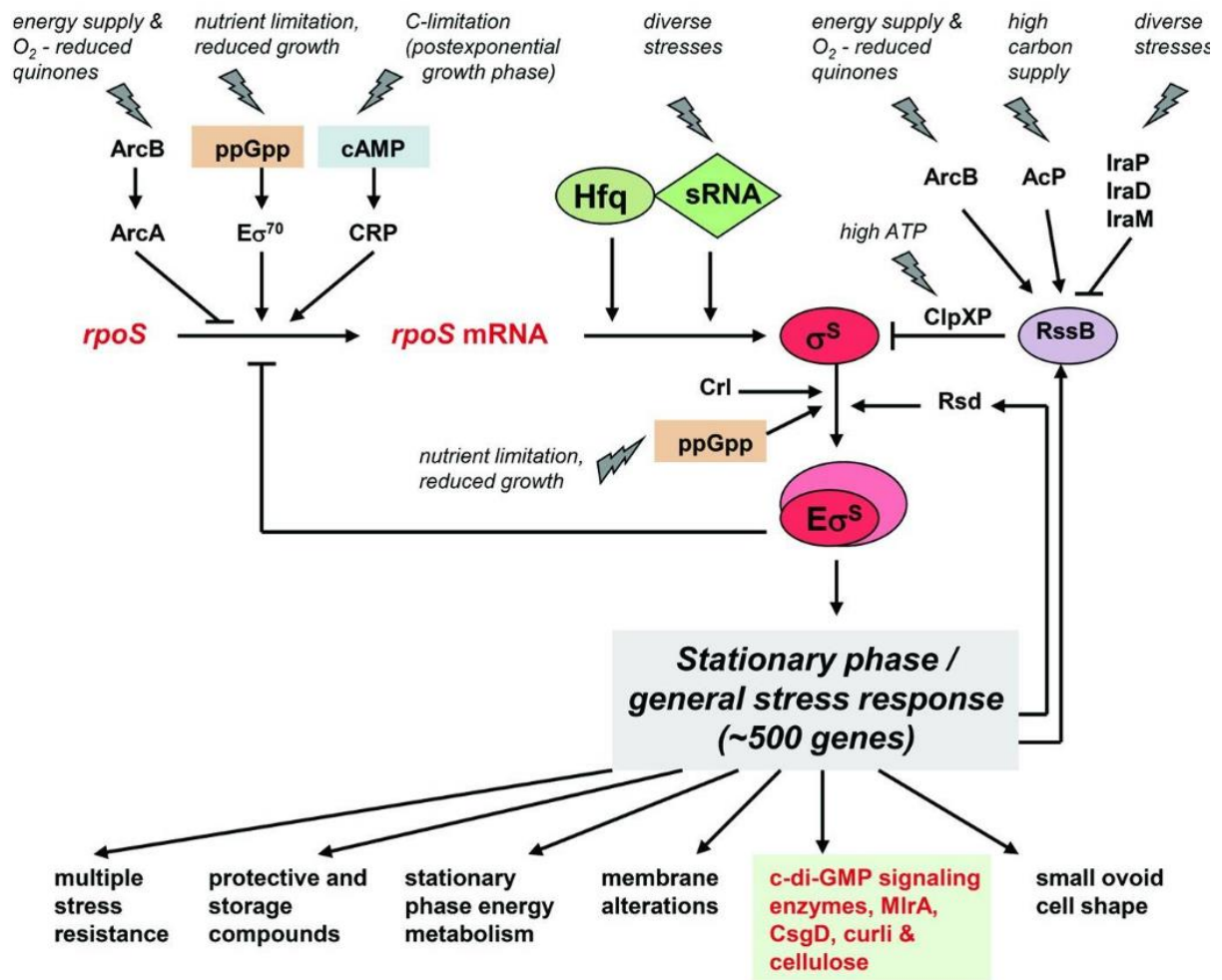


Figure 44 - Régulation de RpoS chez *E.coli* sous contrôle des facteurs environnementaux. Il existe au moins quatre niveaux de contrôle, la transcription de *rpoS*, la traduction de l'ARNm, l'activation de RpoS via la liaison avec une enzyme et la protéolyse de RpoS. De nombreux signaux environnementaux impactent la régulation de *rpoS* tel que le ppGpp en réponse à une carence en nutriment (Mika et Hengge 2014).

l'épuisement en nutriment du milieu, un choc osmotique, un stress thermique, un pH acide ou un stress oxydatif. Afin de survivre à ces variations d'environnement les bactéries s'adaptent rapidement et régulent de nombreux gènes nécessaires à la réparation des dommages causés par les stress et favorisant le retour à l'homéostasie (H. Weber et al. 2005). Chez *E. coli*, le déclenchement de la réponse globale au stress passe par le facteur sigma alternatif de réponse au stress RpoS qui régule directement ou indirectement 10% du génome de la bactérie (Battesti, Majdalani, et Gottesman 2011). La synthèse et l'arrêt de la dégradation du facteur RpoS se font en réponse à des conditions environnementales hostiles, en cas de famine ou de stress. La quantité de RpoS est très faible en phase exponentielle et augmente avec l'entrée en phase stationnaire. L'activation de RpoS par un stress peut entraîner l'apparition de phénotypes de tolérance à d'autres stress et notamment aux antibiotiques (**Figure 44**).

2-2 Réponse à une carence en nutriment médiée par le ppGpp

La voie RpoS est notamment induite par la molécule de signalisation Guanosine tetraphosphate (ppGpp) produite lorsque la bactérie rencontre une carence en nutriment. L'augmentation de ppGpp intracellulaire favorise la transcription, traduction et l'arrêt de la dégradation de RpoS (Battesti, Majdalani, et Gottesman 2011). Le ppGpp est un second messenger intervenant dans la modulation de la transcription et de l'activité de protéines nécessaire pour la survie de la bactérie à la carence en nutriments et pour l'arrêt de sa croissance. Il inhibe la synthèse de l'ADN, des phospholipides et du peptidoglycane de la paroi cellulaire de la bactérie. (Haurlyuk et al. 2015; Srivatsan et Wang 2008). Chez *E. coli*, RelA, une ppGpp synthétase est activée en cas de choc thermique et de carence en acides aminés. SpoT, une ppGpp synthétase/hydrolase est, elle, activée lors d'une carence en carbone, azote, phosphate, fer et acide gras. le régulateur pléiotrope de la transcription DksA fonctionne en lien avec la concentration de ppGpp (L. Brown et al. 2002). Les stress métaboliques et notamment la carence en nutriment étant un déclencheur de la formation de cellules en persistance de nombreuses études se sont concentrées sur les liens entre la réponse stringente et la persistance. Une déficience dans la production de ppGpp entraîne une réduction du nombre de persistants dans la population, ainsi des mutants *relA spoT* chez *E. coli* et *P. aeruginosa* forment moins de cellules persistantes en phase exponentielle, en

phase stationnaire, mais également lors de la formation de biofilm (Viducic et al. 2006; Fung et al. 2010; Svenningsen et al. 2019).

2-3 Réponse SOS

La réponse SOS est mise en place lors d'un dommage à l'ADN causé par un environnement hostile ou un dysfonctionnement cellulaire. La réponse SOS par activation de divers systèmes toxine-antitoxine (voir ci-dessous), intervient sur la modulation de la formation de persistants et permet également la réparation de leur ADN (Dörr, Vulić, et Lewis 2010). Les bactéries déficientes pour le système SOS présentent un taux plus faible de persistants et cela est particulièrement vrai pour la persistance induite par des doses subinhibitrices de quinolones (Dörr, Lewis, et Vulić 2009). La réponse SOS est plus importante chez des bactéries adoptant le mode de vie biofilm que sous la forme planctonique (Fung et al. 2010; Bernier et al. 2013).

3 Quorum sensing

La formation de persistants peut être coordonnée au sein d'une population bactérienne par l'utilisation d'une signalisation intercellulaire (Leung et Lévesque 2012). Chez *P. aeruginosa* et *Streptococcus mutans*, la pyocyanine, l'acyl-homosérine lactone et le peptide CSP, des molécules de signalisation produites en réponse à des stress environnementaux (antibiotiques, stress hyperosmotique, stress thermique) induisent l'apparition de persistants (Kim et Park 2015; Möker, Dean, et Tao 2010). Chez *E. coli*, l'indole qui est une molécule de signalisation de phase stationnaire intervenant dans la formation de biofilm peut induire la formation de persistants (Martino et al. 2003). En condition de carence en nutriment, les bactéries produisent de l'indole qui sera reconnu de façon hétérogène dans la population bactérienne entraînant une réponse protectrice via l'induction des voies du stress oxydant dépendant de OxyR et des protéines Psp impliquées dans la réponse aux phages ; cette cascade de signalisations provoque la formation de bactéries persistantes (Vega et al. 2012).

4 Système toxine antitoxine

Les systèmes toxine/antitoxine (TA) sont omniprésents sur les génomes (chromosomes et plasmides) des microorganismes, ils sont composés d'une toxine stable délétère pour les fonctions essentielles de la bactérie et d'une antitoxine instable neutralisant la toxine (Harms et al. 2018). La toxine, si elle n'est pas contrôlée par l'antitoxine, peut tuer la bactérie (**Figure 45**). Initialement décrits pour leur rôle dans la maintenance des plasmides, ces systèmes semblent être des éléments importants dans la mise en place de changement de phénotypes de quelques bactéries dans une population. Ces systèmes ont des fonctions redondantes et peuvent être classés en 6 catégories ; i) les antitoxines de type I sous forme d'ARN qui inhibe l'ARNm de la toxine protéique ; ii) les antitoxines de type II de type protéique inhibant la toxine protéique ; iii) les antitoxines de type III de type ARN qui inhibe directement la toxine ; iv) les antitoxines de type IV de type ARN qui modifie l'activité de la toxine de façon indirecte ; v) Le type V correspond à une endoribonucléase qui dégrade l'ARNm de la toxine ; vi) le type VI correspond à un adaptateur protéolytique de la toxine (**Figure 46**) (Ronneau et Helaine 2019; Harms et al. 2018). Les systèmes TA sont contrôlés par autorégulation et fréquemment modulés par la réponse SOS ou la réponse à une carence en nutriment médiés par le ppGpp (Shan et al. 2017; Verstraeten et al. 2015; Singletary et al. 2009; Vogel et al. 2004; Kawano, Aravind, et Storz 2007). L'activation des systèmes TA correspond à une perturbation de la balance toxine/antitoxine, l'activation se fait de manière graduée ne supprimant pas totalement la croissance bactérienne, mais la ralentissant progressivement permettant la modification de la physiologie des bactéries et l'accroissement de la tolérance au stress (Tamman et al. 2014; Vázquez-Laslop, Lee, et Neyfakh 2006).

4-1 Action par le ppGpp, exemple de HipAB

Le système HipAB est le premier couple toxine/antitoxine pour lequel un rôle dans la persistance a été mis en évidence chez *E. coli* (Korch, Henderson, et Hill 2003; Balaban et al. 2004; Falla et Chopra 1998). Ce système fait partie de la catégorie des TA de type II. Une augmentation du ppGpp dans la cellule provoque l'accumulation de polyphosphate grâce à l'action de la polyphosphate kinase. Le polyphosphate permet la stimulation de la protéase

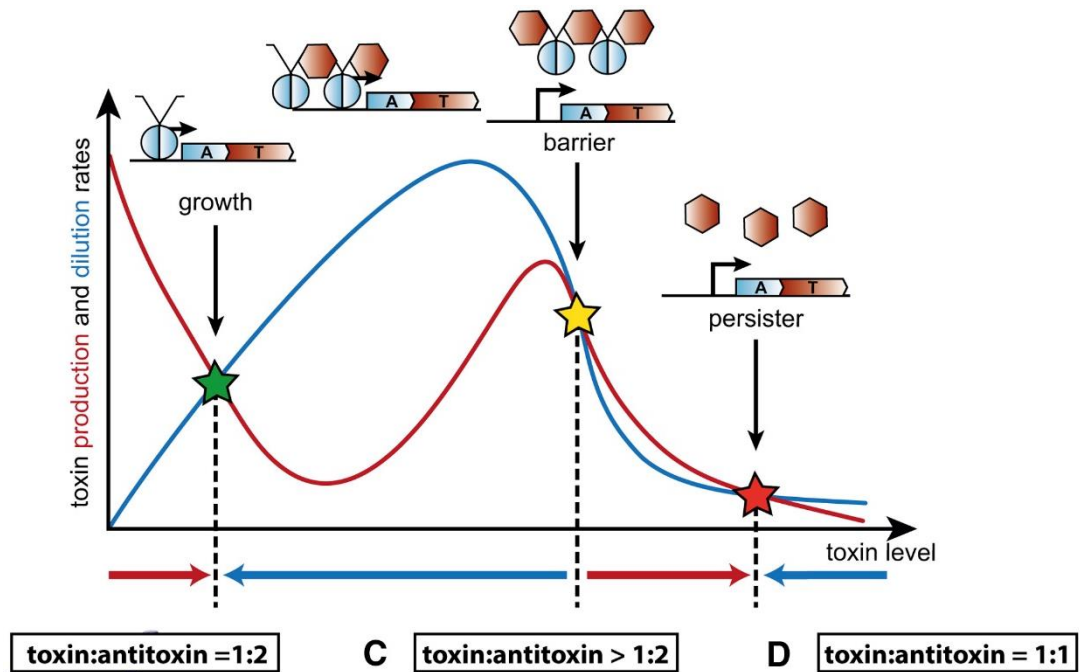


Figure 45 - Autorégulation transcriptionnelle des modules TA de type II grâce à la coopérativité conditionnelle. L'axe horizontal représente les rapports de protéines de toxine/antitoxine et l'axe vertical, le taux de production de toxines (ligne rouge) et son taux de dilution (ligne bleue). Au-dessus sont représentées les formes typiques de complexes d'AT dans chaque région. Selon que le taux de production dépasse le taux de dilution ou est plus bas, la toxine s'accumule (flèches rouges du bas) ou s'épuise (flèches bleues du bas). Les trois étoiles indiquent les niveaux de toxines où la production et le taux de dilution sont équilibrés, cela correspond à un état stable. L'étoile verte représente une croissance bactérienne régulière, où la transcription du module TA est réprimée et la toxine est stockée dans des complexes TA. Dans cet état, l'accumulation de toxines doit surmonter la barrière de la coopérativité conditionnelle (étoile jaune) pour passer à l'état dominé par les toxines (étoile rouge). Le comportement de commutation de l'activation et de la répression du module TA se traduit par les flèches bleues et rouges divergentes autour de la barrière de la coopérativité conditionnelle (étoile jaune). (Harms et al. 2018)

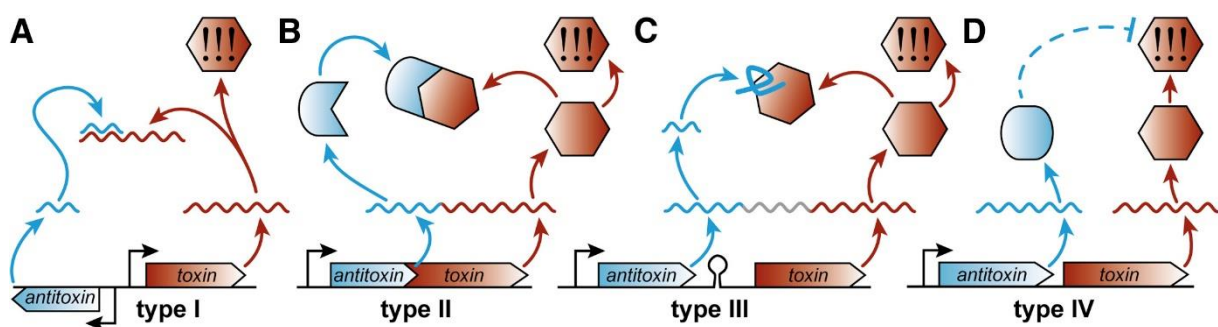


Figure 46 - Les quatre principaux types de modules TA. Résumé des différents modes de contrôle des toxines (rouges) par des antitoxines apparentées (bleues) dans les modules TA de type I à IV. Les locus génétiques et les positions des promoteurs sont représentés avec des flèches colorées et noires respectivement. Les ARN sont dessinés en lignes ondulées. Les molécules de toxine actives libérées du contrôle antitoxine sont mises en évidence par des points d'exclamation. A) Module de TA de type I. B) Module de type II. C) Module de Type III. D) Module de type IV. (Harms et al. 2018)

Lon (Rotem et al. 2010). Lon dégrade l'antitoxine HipB ce qui libère HipA. HipA est une sérine-thréonine kinase qui inhibe la traduction par phosphorylation de glutamyl-ARNt synthétase (GltX), qui conduit à l'accumulation d'ARNt non chargés dans la cellule (Kaspy et al. 2013). Ces ARNt non chargés dans le site ribosomal activent la production du ppGpp via RelA induisant une boucle de régulation positive et conduisant à la formation de persistants incapables de traduire les protéines (Kaspy et al. 2013). Une souche d'*E. coli* possédant une mutation ponctuelle dans le gène *hipA* (*hipA7*) produit de manière constitutive 100 fois plus de persistants que la souche sauvage (Balaban et al. 2004) (**Figure 47**).

4-2 Réponse SOS, exemple de TisAB

Face à des lésions potentielles à l'ADN la stratégie adoptée est à la fois de mettre en place la réparation et d'augmenter le taux de persistants dans la population. La réponse SOS induit l'expression de la toxine TisB chez *E. coli* mise en évidence dans son implication dans la formation de persistants présentant une tolérance élevée aux fluoroquinolones. TisB inhibe la synthèse de l'ATP et induit la persistance des bactéries (Dörr, Vulić, et Lewis 2010).

4-3 Implication d'un phage dans le phénotype de persistance associé aux TA

Il a été mis en évidence récemment la présence du bactériophage lysogène $\phi 80$ dans la souche d'*E. coli* $\Delta TA10$ K12 MG1655 utilisée pour l'étude des systèmes TA en laboratoire. L'activation du bactériophage lysogène $\phi 80$ réduit la capacité des souches délétées des systèmes TA à former des persistants (Harms et al. 2017). Les conclusions de la réévaluation de la délétion des 10 systèmes TA sur l'impact de la formation des persistants a confirmé l'implication du ppGpp et de Lon dans la formation de persistants, mais a remis en doute l'importance de ces TA dans des conditions non stressantes pour la bactérie. Les systèmes TA ne seraient alors pas induits de manière spontanées, mais sous contrôle d'un stress (Goormaghtigh et al. 2018). Néanmoins la mise en évidence de cet artefact n'est pas suffisant pour remettre en cause l'implication des systèmes TA dans la formation de

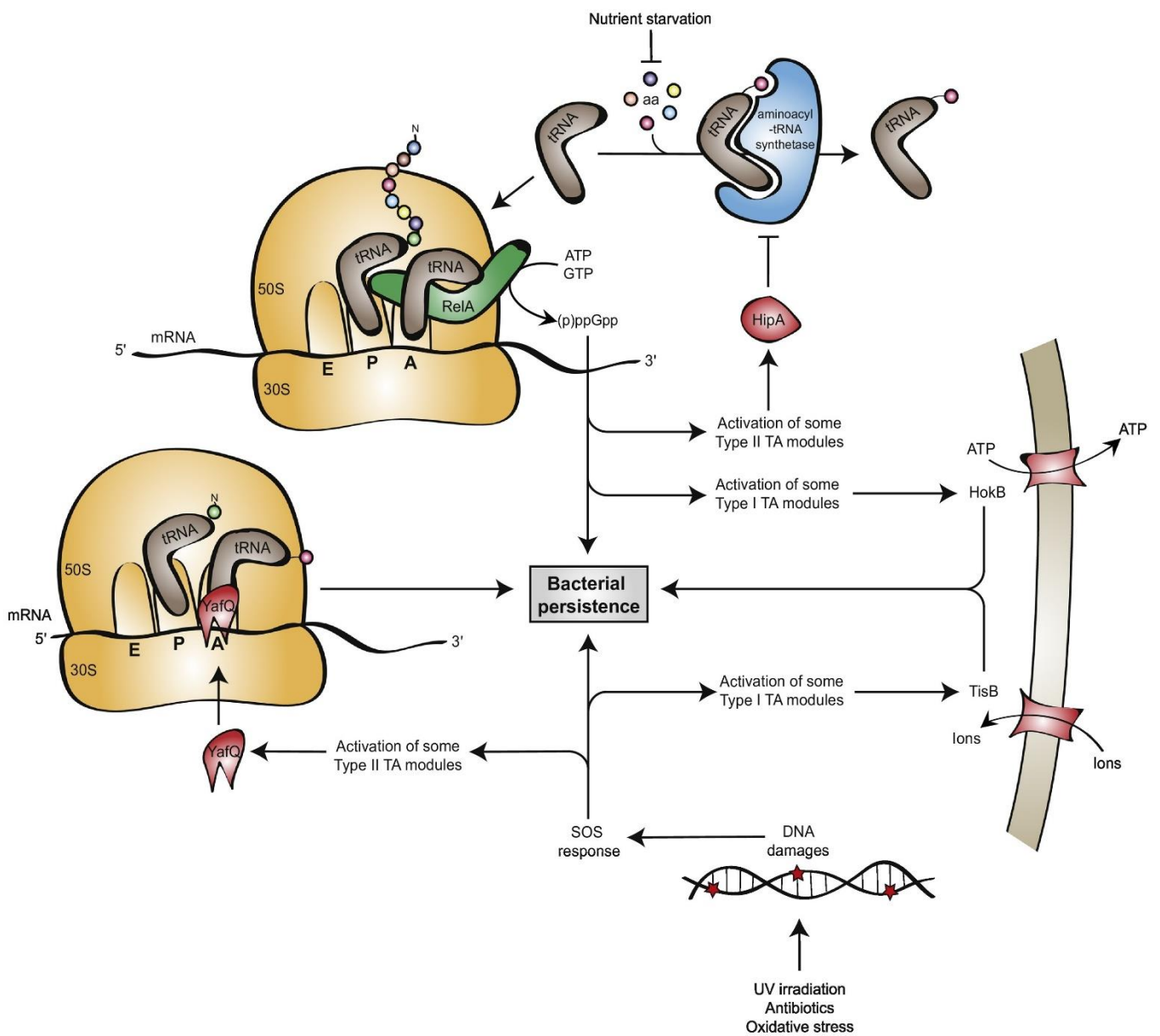


Figure 47 - Régulation des modules TA par la réponse aux stress contribuant à la persistance bactérienne. En cas de privation d'acides aminés ou de surproduction de la toxine HipA, l'ARNt non chargé dans le site ribosomal A favorise l'accumulation de ppGpp par RelA ce qui entraîne une augmentation du nombre de cellules persistantes dans la population. Le ppGpp active également des modules TA spécifiques de type I et II qui contribuent à la persistance bactérienne, telle que la toxine de type I HokB. De la même manière, la réponse SOS déclenche l'activation de modules TA spécifiques de type I et II qui participent à l'augmentation du nombre de cellules persistantes dans la population bactérienne (Ronneau et Helaine 2019).

persistants puisque d'autres études viennent appuyer leurs effets. Il reste clair que les TA ont un impact sur la croissance des bactéries et augmentent l'hétérogénéité au sein d'une population favorisant la persistance bactérienne en réponse à différents stress impliquant la carence en nutriment ou la réponse SOS (Ronneau et Helaine 2019).

5 Résistance phénotypique

La résistance phénotypique à l'instar des persistants, permet à une partie de la population bactérienne de tolérer un traitement antibiotique ou un stress environnemental. Elle implique une adaptation phénotypique non héréditaire permettant la dégradation, l'élimination ou la modification de l'antibiotique ou la modification de la cible de l'antibiotique. La différence avec les persistants est que ces bactéries ne présentent pas une diminution de la croissance et du métabolisme. Une résistance phénotypique comprend l'expression entre autres de pompes à efflux (K. N. Adams et al. 2011; Fisher, Gollan, et Helaine 2017).

6 Persistance et infection

L'échec des traitements antibiotiques et la récurrence de nombreuses maladies pourraient être dus à la haute tolérance des bactéries en persistance aux stress et aux antibiotiques rencontrés ainsi qu'à leur capacité ultérieure à reprendre leur croissance (Rhen et al. 2003; Balaban et al. 2004; K. N. Adams et al. 2011; Arnoldini et al. 2014). L'hétérogénéité phénotypique au sein d'une population créée par l'apparition de persistants confère une haute adaptabilité des bactéries à leur environnement. Les traitements antibiotiques répétés peuvent également provoquer l'apparition de bactéries résistantes à partir du pool de persistants (Levin-Reisman et al. 2017; Van den Bergh et al. 2016). Comme mentionné plus haut dans cette introduction, les infections des voies urinaires causées par les UPEC ont une très forte probabilité de récurrence due à la présence d'un réservoir de bactéries dormantes dans les cellules épithéliales. C'est également le cas pour les infections causées par *M.*

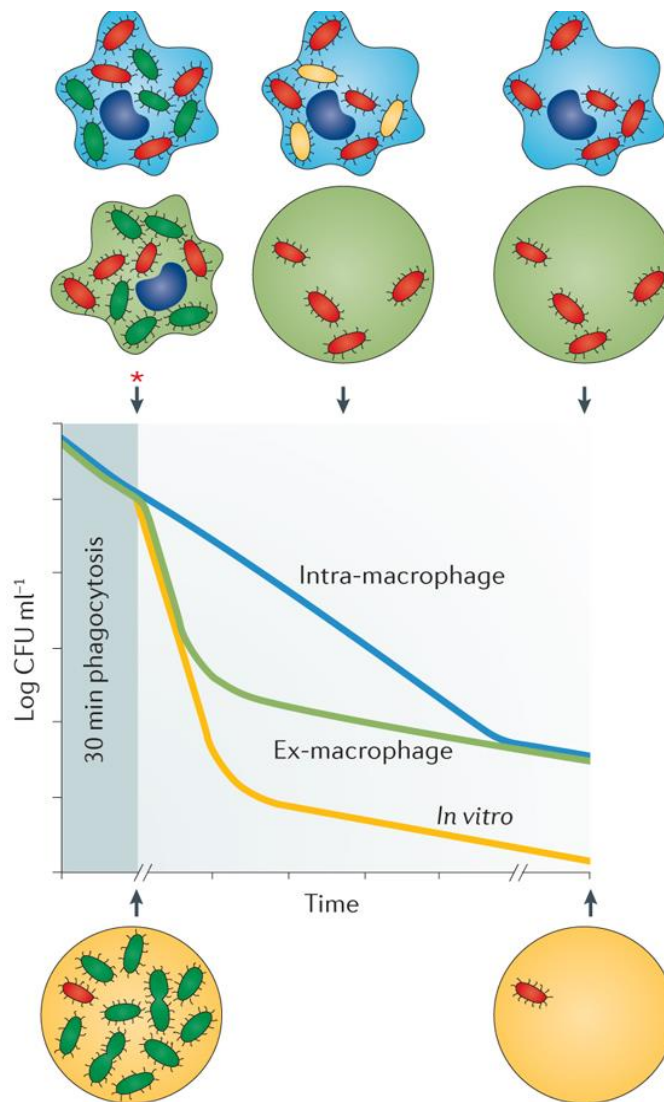


Figure 48 - Cinétique de survie à la céfotaxime de *Salmonella spp.* Croissance dans du milieu Luria-Bertani (LB) (orange), la croissance des bactéries dans du milieu LB après 30 min d'internalisation dans les macrophages puis croissance en LB (vert) et intra-macrophages (bleu). L'astérisque rouge indique l'ajout de céfotaxime dans le milieu. Les bactéries qui ont été cultivées dans du milieu LB (orange) étaient principalement des cellules susceptibles d'être tuées par des antibiotiques (bactéries vertes), représentés par la nette diminution du nombre d'UFC, avec une petite fraction persistante (bactéries rouges) pouvant être observée par la diminution plus lente ultérieure du nombre d'UFC (unité formant colonie). Après 30 min de phagocytose par les macrophages, suivie de la libération des bactéries dans du milieu LB contenant de la céfotaxime (vert), la courbe est similaire à celle des bactéries traitées à la céfotaxime *in vitro*, mais avec une plus grande fraction de persistants. Les bactéries intra-macrophages (bleues) ont également une large fraction de persistants, comme en témoigne la lente diminution des UFC vers la fin de la courbe (Fisher, Gollan, et Helaine 2017)

tuberculosis, *S. aureus* ou *P. aeruginosa* (Gomez et McKinney 2004; Lyczak, Cannon, et Pier 2002). Hormis la résistance/tolérance aux antibiotiques, les infections persistantes peuvent être causées par l'échec du système immunitaire à éliminer le pathogène. Les agents pathogènes possèdent différentes stratégies pour éviter la reconnaissance du système immunitaire, moduler les réponses immunitaires, modifier leur environnement intravacuolaire ou interférer avec la réponse adaptative favorisant la création de niches bactériennes pouvant contenir des persistants (Fisher, Gollan, et Helaine 2017). La présence de stress inhérent au processus d'infection augmente le taux de persistants dans la population. Chez *S. typhimurium*, un passage de 30 minutes dans des macrophages est suffisant pour augmenter de plusieurs centaines de fois le nombre de bactéries persistantes dans la population (**Figure 48**). Les conditions acides et pauvres en nutriment lors de la phagocytose stimulent la formation de ce phénotype (Helaine et al. 2014). La population de *Salmonella* à l'intérieur des macrophages s'avère être très hétérogène. La population globale est plus tolérante aux antibiotiques, car se réplique plus lentement qu'*in vitro* en milieu riche. À l'intérieur de cette population se trouvent des bactéries en croissance encore plus lente et des bactéries en persistance ne se divisant plus et présentant une excellente tolérance. Les bactéries avec le niveau de croissance intermédiaire ont pu se répliquer sans être rapidement dégradées par un traitement antibiotique et pourraient être responsables de l'échec des traitements antibiotiques et de la chronicité alors que la fraction en état de persistance non répliatif peut intervenir dans la résurgence de la maladie. Au cours de l'infection, les bactéries se divisant, même lentement, ont un fort risque d'être tuées par les stress environnants et progressivement de disparaître pour ne laisser que les bactéries en persistance (Claudi et al. 2014) (Fisher, Gollan, et Helaine 2017).

Une des méthodes utilisées pour l'étude des persistants, notamment chez *Samonella*, est l'utilisation de rapporteurs fluorescents (**Figure 49**). Un plasmide comprenant un fluorophore pouvant se diluer au cours des générations permet la mesure de l'activité métabolique des bactéries à l'échelle de la cellule unique sans l'utilisation d'antibiotiques (Helaine et al. 2010; 2014). Cet outil permet d'envisager un tri des cellules en fonction de leur activité (FACS, microfluidique).

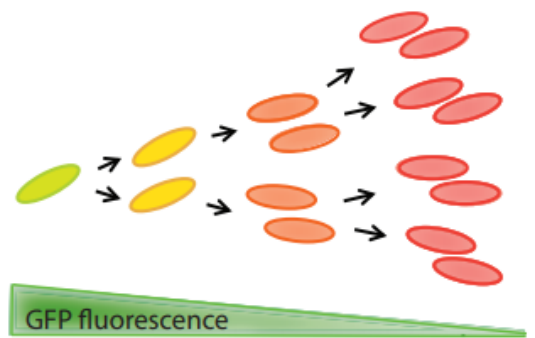
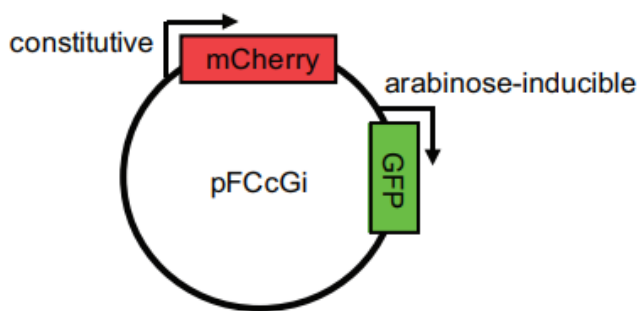


Figure 49 - Plasmide de dilution de fluorescence. L'expression de protéines fluorescentes à partir du plasmide pFCcGi est constitutive pour *mCherry* et sous le contrôle d'un promoteur inducible par l' *arabinose* pour la *gfp* . En l'absence d'arabinose, les niveaux de fluorescence de la GFP chez les bactéries pré-induites sont dilués au fur et à mesure des tours successifs de division cellulaire. (Figueira et al. 2013)

7 Biofilm et persistance

Le traitement des biofilms aux antibiotiques crée une courbe de survie biphasique caractéristique de la présence de persistants (Brooun, Liu, et Lewis 2000). La création de micro- environnements au sein de la matrice présentant des carences en nutriment, un pH acide ou des stress oxydatifs favorise la création du phénotype de persistance. *Pseudomonas aeruginosa* et les UPEC précédemment décrits dans la partie biofilm sont capables de former des biofilms lors de l'infection, la présence de phénotype de persistance contribue à la chronicité des infections provoquées.

Imaging the Cell Cycle of Pathogen *E. coli* During Growth in Macrophage

Gaëlle Demarre, Victoria Prudent, and Olivier Espéli

Abstract

The study of the bacterial cell cycle at the single cell level can not only give insights on the fitness of the bacterial population but also reveal heterogeneous behavior. Typically, the DNA replication, the cell division, and the nucleoid conformation are appropriate representatives of the bacterial cell cycle. Because bacteria rapidly adapt their growth rate to environmental changes, the measure of cell cycle parameters gives valuable insights for the study of bacterial stress response or host–pathogen interactions. Here we describe methods to first introduce fluorescent fusion proteins and fluorescent tag within the chromosome of pathogenic bacteria to study these cell cycle steps; then to follow them within macrophages using a confocal spinning disk microscope.

Key words *parS* sites, Microscopy, Fluorescence

1 Introduction

This method is dedicated to the investigation of the bacterial cell cycle during host infection, via the observation by fluorescence microscopy of chromosome tags, nucleoid-associated protein, and FtsZ ring formation. The bacterial cell cycle has been studied for decades in controlled conditions of laboratory growth. Most of the work has focused on growth in the absence of environmental stress. However, in their natural environment bacteria frequently encounter lack of nutrients and oxidative, genotoxic, or acidic stress. The progress of imaging methods allows for the evaluation of the bacterial cell cycle during host cell infection. The present protocol describes classical methods of cell cycle analysis by fluorescence microscopy adapted to the imaging of AIEC (Adherent Invasive *E. coli*) LF82 bacteria [1] during growth inside acidic phagolysosome of macrophages.

FROS (Fluorescent Repressor Operator Sequence) [2, 3] and *parS*/ParB-GFP [4] tags have been used to label specific loci and follow chromosome choreography [5, 6]; the number of foci

within a given cell is also a good indication of the availability of nutrients in the environments [7]. The labeling of the chromosome with the nucleoid associated protein HU fused with mCherry [8] is also an indicator of the environment encountered by the bacteria. The shape of bacterial nucleoid changes according to the nutrient used by the bacteria [9] and when genotoxic [10] or oxidative stress [11] is present. Finally cell division can be monitored by the observation of the main septal ring protein FtsZ [12, 13]. FtsZ polymerization is targeted by two cell cycle checkpoints, the SOS regulon and the Nucleoid Occlusion system that would modify the timing of division and provoke cell elongation [14, 15]. Therefore, imaging of the origin of replication, the nucleoid, and the septal ring are good indicators of the bacterial adaptation to an environmental challenge. We selected HU-mCherry, *oriC::parS/ParB-GFP*, and FtsZ-GFP fluorescent reporters because they produce robust signals that tolerate fixation and successive illumination during Z stack acquisition and can be accurately scored by image analysis tools such as Oufi [16], Fiji [17], or ObjectJ (<https://sils.fnwi.uva.nl/bcb/objectj/index.html>).

2 Material

2.1 Plasmids, Strains, and Primers

Human cell line:

THP1 (ATCC® TIB202™).

Bacterial Strains:

LF82 [18] Δbla (a generous gift from Nicolas Barnish).

MG1655 Hu-mcherry [19].

Plasmids:

pKOBEGA (pSC101, amp, TS) [20].

pCP20 (pSC101, amp, TS) [21].

pAD37 (R6k, cm) [22].

pFH2973 [23].

pFWZ5 [24].

Primers:

Construction of the HU-mCherry strain

hupA-up	AAGGATAACTTATGAACAAGACTC
hupA-down	AACAGTAATTGCGAACCTTCGG
hupA verif up	CGTCGCACTCGATGCTTAGC
hupA verif down	CCAGTGGATTTGCTGAAGACC

Insertion *parS_{pMTI}* (pAD37) (*FRT-aph-FRT-parS_{pMTI}*).

UpT1	5' <50nt homology to <i>oriC</i> region (position-position) >CGG CTG ACA TGG GAA TTA GCC
DownT1	5' <50nt homology to <i>oriC</i> region (position-position) >GGT CTG CTA TGT GGT GCT ATC T

2.2 Reagents: Stock Solutions

All solutions must be prepared using ultrapure water (by purifying deionized water, to attain a sensitivity of 18 MΩ-cm at 25 °C).

Prepare the following buffers and stock solutions. Unless otherwise specified, filter solutions using a 0.2 μm low protein binding nonpyrogenic membrane.

10% glycerol in H₂O cold.

Lennox broth (LB).

100 mg/ml ampicillin.

50 mg/ml kanamycin.

30 mg/ml chloramphenicol (pAD37).

20% arabinose.

1M IPTG.

2.3 Cell Culture

800 μg/ml PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate).

RPMI 1640 without L-glutamine supplemented with 10% decompartmented fetal bovin serum and 2 mM glutamine (Life Technologies).

Keep at 4 °C no more than 1 month.

1× phosphate buffer saline (PBS).

24-well plate (1.9 cm², no coating).

2.4 Cell Fixation

Cold methanol kept at −20°C.

Fluorescence mounting medium: Dako S3023.

Microscope slides: 76 × 26 mm.

Microscope glass coverslips, 12 mm diameter, no coating.

2.5 Molecular Biology and Microbiology Material

Shaker: Infors Minitron.

Water bath.

Vacuum concentrator: miVac, Genevac.

PCR: C1000 Thermal cycler, Bio-Rad.

Electroporator: Micropulser, Bio-Rad.

- 2.6 Microscope** Inverted Zeiss Axio Imager with spinning disk CSU W1 (Yokogawa):
 100× objective, NA = 1.4, oil, WD = 0.13 (WD: working distance in mm).
 Camera ORCA-Flash 4.0 digital CMOS.
 Lasers:
 490 nm at 150 mW.
 561 nm at 100 mW.
 642 nm at 110 mW.
 Metamorph Premier 7.6 software.

3 Methods

3.1 Strain Construction

AIEC LF82 will be genetically engineered to observe the nucleoid with HU-mCherry, the origin of replication with a *parS*_{MT1} tag and the septal ring with a plasmid expressing FtsZ-GFP.

a. Transform AIEC LF82 with the plasmid pKOBEGA

Prepare competent bacteria using a protocol adapted for the strain of interest. For AIEC LF82, a culture of OD = 0.6 is washed 3 times in ice-cold 10% glycerol and the final resuspension volume is 1/250 of the initial volume.

Transform 50 µl of competent bacteria with 30 ng of pKOBEGA.

Plate at 30 °C on ampicillin (100 µg/ml).

b. Construction of AIEC LF82 HU-mCherry strain with λ Red (*γ*, *β*, *exo*) recombination [21]

b1. Prepare competent bacteria expressing λ Red (*γ*, *β*, *exo*) proteins as follows:

Dilute 500-fold an overnight culture of AIEC LF82 containing pKOBEGA in 50 ml LB (100 µg/ml amp, 0.15% arabinose).

Incubate with shaking at 30 °C up to OD_{600nm} = 0.6.

Incubate at 42 °C for 15 min.

Chill the culture in an ice-water bath for 15 min.

Centrifuge for 10 min at 5000×g at 4 °C.

Discard the supernatant and wash cell pellet with 25 ml of 10% cold glycerol.

Centrifuge for 10 min at 5000×g at 4 °C.

Wash cell pellet with 12 ml of 10% cold glycerol.

Centrifuge for 10 min at $5000\times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Wash cell pellet with 6 ml of 10% cold glycerol.

Centrifuge for 5 min at $5000\times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Resuspend the cell pellet in $150\text{ }\mu\text{l}$ 10% cold glycerol.

b2. Transform with *hupA-mcherry* PCR product prepared as follows

Perform 10 PCR of $50\text{ }\mu\text{l}$:

PCR Mix for $50\text{ }\mu\text{l}$.

$5\text{ }\mu\text{l}$ $10\times$ Extaq buffer.

$5\text{ }\mu\text{l}$ dNTP mix (2 mM each).

50 ng of genomic DNA (strain MG1655HU-mcherry).

$2.5\text{ }\mu\text{l}$ of $10\text{ }\mu\text{M}$ primer hupA-up.

$2.5\text{ }\mu\text{l}$ of $10\text{ }\mu\text{M}$ primer hupA-down.

1 unit Extaq Polymerase.

$33.7\text{ }\mu\text{l}$ H_2O .

PCR conditions:

Initial denaturation:

$98\text{ }^{\circ}\text{C}$ —3 min.

30 cycles:

$98\text{ }^{\circ}\text{C}$ —10 s.

$57\text{ }^{\circ}\text{C}$ —30 s.

$72\text{ }^{\circ}\text{C}$ —1 min/kb.

Final extension:

$72\text{ }^{\circ}\text{C}$ —10 min.

Hold:

$12\text{ }^{\circ}\text{C}$.

The expected fragment size is about 3 kb.

Concentration of PCR product:

Use PCR purification kit to clean the DNA (three columns for 10 PCRs, elution with $100\text{ }\mu\text{l}$ elution buffer per column); pool the three elutions in one tube.

Concentrate the DNA with a vacuum concentrator at $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ up to a final volume of $30\text{ }\mu\text{l}$.

Dialyze 30 min on filter membrane (Millipore $0.02\text{ }\mu\text{m}$) floating on a petri dish filled with ultrapure water.

Electrotransformation of the PCR product:

Preincubate the electroporation cuvette (2 mm) in ice.

In a microcentrifuge tube mix ~5 µg of PCR product with 90 µl of the electrocompetent bacteria.

Transfer the mix to the precooled cuvette. Keep on ice.

Dry the cuvette. Insert it in the electroporator and immediately pulse at 2500 V.

Immediately add 1 ml of LB. Mix thoroughly with the bacteria and transfer to a 2 ml tube.

Incubate for 1 h at 37 °C with shaking.

Plate 100 µl of the transformation on 75 µg/ml kanamycin plate (*see Note 1*).

Centrifuge for 2 min the rest of the transformation tube.

Remove the supernatant.

Resuspend the cell pellet with 100 µl of LB, plate it on 75 µg/ml kanamycin plate.

Incubate overnight at 37 °C.

c. Delete the kanamycin gene through the flipase/FRT recombination

When it is required, the kanamycin resistance gene can be removed with Flp recombination using the protocol described in [21]. Choose kn^S and amp^S colonies.

d. Construction of AIEC LF82 HU-mCherry strain with a $parS_{pMTI}$ tag near *oriC*

Prepare $parS_{pMTI}$ product by PCR as described in paragraph b2 with 1ng of pAD37 as template and the primers UpT1 and downT1. The size of the expected fragment is about 1.7 kb.

Transform the AIEC LF82 HU-mcherry strain with the pKO-BEGA plasmid.

Prepare AIEC LF82 HU-mcherry pKOBEGA competent bacteria expressing lambda red (beta exo and gam) proteins as described in the paragraph b2.

Transform the strain HU-mcherry *oriC::parS_{pMTI}-FRT-aph-FRT* with the pFH2973. Select transformants on 100 µg/ml ampicillin plates.

e. Construction of AIEC LF82 HU-mCherry strain with a plasmid expressing FtsZ-GFP

Transform the AIEC LF82 HU-mcherry strain with the pFWZ5 plasmid.

3.2 Infection

a. Differentiation of THP1 monocytes in macrophages (*see Note 2*)

Prepare a 5×10^5 cell/ml cell suspension in the cell growth medium.

Just before use, dilute 5 μl of the 800 μM stock of PMA in 195 μl of growth medium (*see Note 3*).

Add diluted PMA at a 1000 \times dilution into the cell suspension.

Introduce a circular coverslip in each well.

Load 1 ml of cell suspension in each well. Remove the bubbles from under the coverslip by softly pressing on the coverslip with a pipette

Incubate for 18 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ with 5% CO_2 .

b. AIEC LF82 culture

Growth the AIEC LF82 strain of interest overnight in LB supplemented with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin and 2 μM IPTG (to induce ParB-GFP from pFH2973). Measure $\text{OD}_{600\text{nm}}$, it should be close to 4.

Dilute them in 1 \times PBS up to an $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of 0.4.

c. Infection

Check the THP1 cells; they should form heaps (*see Note 4*).

Wash the differentiated macrophages with 1 \times PBS. Eliminate the medium by inverting the plate over a trash bin and then above an absorbing paper.

Add 1 \times PBS drop by drop on the wall of the well.

Mix gently by rotation.

Add 1 ml of growth medium.

Add 78 μl of the bacterial suspension.

Mix gently by rotation.

Centrifuge for 10 min at 900 rpm at room temperature.

Incubate for 10 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ with 5% CO_2 .

Wash twice with 1 \times PBS.

After the second wash, remove the last drop of PBS with a micropipette.

Add 1 ml of cell growth medium supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin in each well.

Incubate for 40 min or 24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ with 5% CO_2 .

3.3 Cell Fixation and Slide Preparation

a. Fixation of infected cells

At the selected time point the cell should be fixed before imaging.

Wash twice with 1 ml of 1 \times PBS.

Add 1 ml of 1 \times PBS and slowly add 1 ml of methanol (kept at -20°C) (1 Vol methanol/1 Vol PBS) (*see Note 5*).

Immediately remove the PBS + methanol mix.
 Add very slowly 1 ml of methanol.
 Incubate for 5 min on ice.
 Keeping the methanol add very slowly 1 ml of 1 × PBS.
 Remove the PBS + methanol mix.
 Add very slowly 1 ml of 1 × PBS.
 Keep in PBS at 4 °C till mounting.

b. Slide mounting

Load one drop (10 µl) of Dako on the microscope slide.
 Remove the coverslip from the plate with a pair of pliers.
 Damp the coverslip in fresh 1 × PBS.
 Drain the PBS for the coverslip holding the coverslip with the pliers.
 Dry the coverslip by touching an absorbing paper with the edge of the coverslip.
 Transfer the coverslip onto the Dako drop, the side of the coverslip with the cell/bacteria should face the slide.
 Incubate overnight at room temperature in the dark.

3.4 Imaging and Image Processing

Imaging is performed on a Zeiss Axio imager microscope equipped with Yokogawa W1 spinning disk confocal head. Routinely, Z stacks of 36 images with a step of 0.4 are recorded to observe the complete macrophage volume. Laser excitations are performed at 488 nm for 600 ms at 80%, 561 nm for 200 ms at 20%, phase contrast for 50 ms. Image acquisition is controlled by Metamorph software.

Images are processed with Fiji for background subtraction, Z projection, Z plane color coding, and 3D reconstructions (Fig. 1). Object counting can be performed in 2D before or after Z projection with Fiji, Oufiti, or ObjectJ. Three-dimensional object counting and measurements can be performed after deconvolution (Huygens, Scientific Volume Imaging) with a 3D reconstruction and analysis tool (Imaris, Bitplane).

4 Notes

1. LF82 transformant selection on kanamycin plates required a kanamycin concentration of 75 µg/ml. This concentration may need to be adjusted in order to avoid false positive and to allow the kanamycin resistance from a single chromosomal copy of the kanamycin resistance gene.

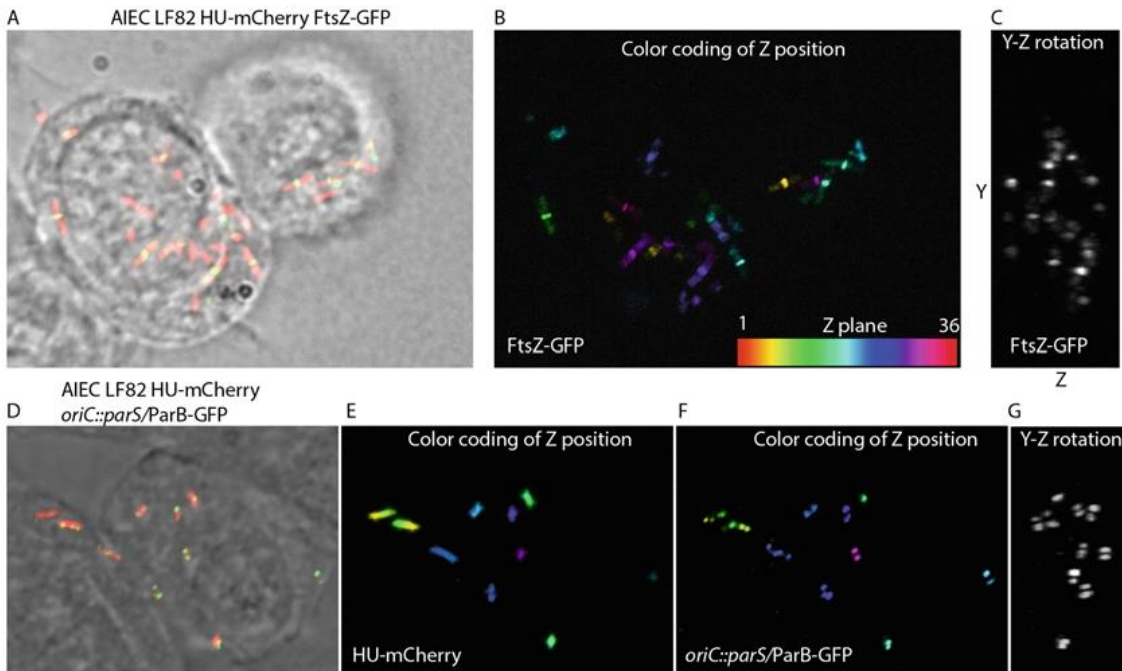


Fig. 1 (a) Representative image of AIEC LF82 HU-mCherry FtsZ-GFP, HU-mCherry (*red*), FtsZ-GFP (*green*). The image corresponds to the Z projection (sum of all planes) for the mCherry and GFP signals merged with the best focus plane of macrophage image. (b) Z plane color coding of the FtsZ-GFP signal. (c) 3D reconstruction and rotation along the YZ axis of the FtsZ-GFP signal. (d) Representative image of AIEC LF82 HU-mCherry *oriC::parS/ParB-GFP*, HU-mCherry (*red*), *oriC::parS/ParB-GFP* (*green*). The image corresponds to the Z projection (sum of all planes) for the mCherry and GFP signals merged with the best focus plane of macrophage image. (e) Z plane color coding of HU-mCherry signal. (f) Z plane color coding of *oriC::parS/ParB-GFP* signal. (g) 3D reconstruction and rotation along the YZ axis of the *oriC::parS/ParB-GFP* signal

2. One to three-week-old THP1 monocytes are differentiated within macrophages.
3. Do not introduce a micropipette in the growth medium bottle. Transfer with a pipette a small volume of the medium in an eppendorf tube. Pipette the 195 μ l from the eppendorf tube.
4. If the macrophages do not form heaps, they are not adherent and thus not differentiated.
5. Methanol and PBS are added very slowly to avoid detachment of the cells.

References

1. Eaves-Pyles T et al (2008) *Escherichia coli* isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. *Int J Med Microbiol* 298:397–409
2. Gordon GS et al (1997) Chromosome and low copy plasmid segregation in *E. coli*: visual evidence for distinct mechanisms. *Cell* 90:1113–1121
3. Lau IF et al (2003) Spatial and temporal organization of replicating *Escherichia coli* chromosomes. *Mol Microbiol* 49:731–743
4. Li Y, Youngren B, Sergueev K, Austin S (2003) Segregation of the *Escherichia coli* chromosome terminus. *Mol Microbiol* 50:825–834
5. Espeli O, Mercier R, Boccard F (2008) DNA dynamics vary according to macrodomain

Matériels et méthodes

Solutions stocks : Toutes les solutions sont préparées en utilisant de l'eau milliQ. 10 % glycerol dans de l'H₂O froid. / Lennox broth (LB). / 100 mg/ml ampicilline. / 50 mg/ml kanamycine. / 50 mg/ml spectinomycine. / 20 % arabinose. / PBS 1X. / 3,7 % PFA. / DMEM 10 % SVF, Glu. / UltraPure Agarose invitrogen (16500-500) 0,8 % TAE 0,5 X. / Triton 1 X. / Milieu Minimum M9 1 X.

Construction des mutants par recombinaison homologue. Méthode de transformation par exploitation du système de recombinaison homologue (λ red). a) Amplifier par PCR la cassette Kanamycine entourée de sites FRT (Flippase Recognition Target) sur le plasmide pAD37 avec les oligos flottants contenant une zone d'homologie de 10 pb avec le plasmide pAD37 suivi d'une zone d'homologie de 50 pb encadrant le gène cible à muter.

Préparer 8 PCR de 50 μ L (PCR Mix pour 50 μ L)	Condition PCR
5 μ L 10X Extaq Buffer.	PCR conditions :
5 μ L dNTP mix (2mM each).	Dénaturation initiale : 98°C – 3min
1 μ L plasmide pAD37.	30 cycles: 98°C – 10s.
2.5 μ L oligo UP "gène d'intérêt".	57°C – 30s.
2.5 μ L oligo DO "gène d'intérêt".	72°C – 1min/kb
1 μ L Extaq Polymérase (polymérase high fidelity - takara).	Final extension : 72°C – 10min
Qsp 50 μ L H ₂ O.	Hold : 12°C

Tableau 1 Mix PCR et conditions utilisées

Le fragment amplifié est purifié (Qiagen ID :28106) puis l'ADN est concentré sous vide (speedVac) à 45 °C pour obtenir un volume final de 30 μ L. L'ADN est dialysé contre de l'eau milliQ 30 min sur une membrane filtre (Millipore 0.2 μ m).

b) Préparation des bactéries compétentes LF82 possédant le plasmide pKOBEGA (plasmide thermosensible portant une cassette de résistance à l'ampicilline, et les gènes red exo et gam du phage λ sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose). Elles sont cultivées (over night, ON) dans du LB -ampicilline (100 μ g.mL⁻¹) à 30 °C 180 rpm. Diluer au 1/100 la culture ON de l'AIEC LF82 contenant le plasmide pKOBEGA dans 50mL de LB (100 μ g/mL ampicilline, 0.15 % arabinose). Incuber à 30 °C 180RPM jusqu'à DO 0,5. Incuber à 42 °C pendant 15 min. Incuber sur glace pendant 10 min. Centrifuger 10 min à 6000 rpm à 4 °C. Enlever le surnageant et resuspendre dans 50 mL de glycérol 10 % à 4 °C. Centrifuger encore 2 fois dans les mêmes

conditions en diminuant de moitié à chaque étape le volume utilisé pour resuspendre le culot. Enfin resuspendre dans 500 µL de glycérol 10 %.

c) Electrotransformation des bactéries compétentes LF82 WT : Transformer 100 µL de bactéries ainsi obtenues avec 10 µg de produit PCR purifié (Qiagen kit PCR purification) dans des cuvettes d'électroporation, impulsion/choc électrique à 2500 V. Ajouter immédiatement 900 µL de LB. Transférer dans un tube de 14 mL et incuber sous agitation à 37 °C 180 rpm pendant 1h. Etaler sur boîte LB kanamycine 75 µg/mL. Incuber pour la nuit à 37 °C.

Vérifications des mutants. Extraire l'ADN génomique des clones avec le PureLink Genomic DNA mini kit (K182002 ThermoFisher). Vérifier les clones obtenus par PCR avec des amorces flanquant le gène d'intérêt, gel d'électrophorèse et séquençage des produits PCR (Eurofins).

Transformation. Diluer au 1/100 d'une culture sur la nuit dans 50 mL de LB 37°C 180 rpm jusqu'à DO 0.5 à 600 nm. Passage de la culture sur glace pendant 10 min. Centrifugation 10 min à 6000 rpm. Resuspendre le culot dans 50 mL d'eau milliQ à 4 °C. Répéter l'opération 2 fois en divisant à chaque fois le volume d'eau par 2. Au dernier lavage, resuspendre dans 300 µL d'eau milliQ. Transformer par électroporation 100µL de suspension bactérienne avec 200 ng d'ADN dans des cuvettes d'électroporation (impulsion électrique à 2500 V). Resuspendre immédiatement dans 900 µL de LB et incuber à 37 °C, 180 rpm pendant 1h. Etaler sur boîte LB contenant l'antibiotique adéquat. Incuber ON à 37 °C.

Plasmide	Caractéristiques	Utilisation
pKOBEGA	Code pour la recombinaison du phage λ, Amp ^R , thermosensible	Délétion de gènes par recombinaison homologue
pAD37	Kan ^R entouré par 2 sites FRT	Amplification de la cassette kanamycine pour recombinaison homologue
pCP20	Amp ^R , exprime la flippase (FLP), thermosensible	Induire la recombinaison des sites FRT pour enlever les gènes de résistance antibiotique présents entre les deux sites
pRPSM mCherry	Spec ^R gène de	Expression constitutive de la

	mcherry, promoteur constitutif	protéine fluorescente mCherry (promoteur RPSM)
pGBMkanGFP	Kan ^R , gène de la GFP promoteur constitutif	Amplification de la GFP accolée à la cassette kanamycine – Expression constitutive de la protéine fluorescente GFP
Psm1690promoteurPAI II	Kan ^R , gène de la GFP promoteur PAI II	Visualisation de l'expression de l'îlot PAI II

Tableau 2 Plasmides utilisés

Conditions de culture pour l'infection. Les souches bactériennes utilisées ont été cultivées en milieu LB sous agitation en incubateur sec ou liquide à 180 rpm à 37 °C. Les cellules eucaryotes sont incubées à 37 °C dans un incubateur maintenu à 5 % de CO₂.

Culture cellulaire et infections. Lignée cellulaire murine RAW 264.7 (Sigma). Les cellules sont cultivées en flasques 75 cm² dans du milieu DMEM (Gibco™) supplémenté à 10 % en Sérum de Veau Foetal (SVF) décomplémenté (inactivation du complément par chauffage à 55 °C pendant 30 min) et 2 mM Glutamine. Les cellules sont réensemencées tous les 3 jours par grattage mécanique. Pour infection, les cellules sontensemencées dans des plaques de 12 puits (surface de croissance de 3.65 cm²) pour les études de la croissance en macrophages par CFU (Unité Formant Colonie), et pour la microscopie dans des plaques de 24 puits (surface de croissance de 1.9 cm²) dans lesquelles on ajoute les lames de microscopie (12 mm de diamètre, sans revêtement). Pour les 2 types de plaques, le jour précédant l'infection, les cellules sontensemencées à 4,75.10⁵ cellules par mL, soit 9,5.10⁵ cellules par puits dans les plaques de 12 puits (2 mL) destinées aux CFU et 4,75.10⁵ cellules par puits dans les plaques 24 puits (1 mL) destinées à la microscopie. Le jour de l'infection, les puits sont lavés avec 2 mL de PBS. Ajout de 1 ou 2 mL de milieu DMEM supplémenté pré-chauffé à 37 °C. Pour les mesures de CFU l'infection est réalisée avec 119 µL d'une culture de nuit de bactéries diluée dans du PBS 1X à DO 0,5. L'infection est réalisée avec une multiplicité d'infection de 100 bactéries pour 1 macrophage (MOI de 100). Pour les expériences d'imagerie, 166 µL d'une dilution des cultures de nuit dans du PBS 1X à DO 0,2.

Les plaques sont centrifugées 10 min à 900RPM pour synchroniser le contact bactéries-macrophages. Incubation 10 min à l'incubateur CO₂ à 37 °C. Lavage des plaques 2 fois au PBS 1X. Ajout du milieu DMEM supplémenté à 20 µg/mL de Gentamicine.

Fixation des cellules. PFA 3.7 % (dilué dans du PBS 1X). Fixation 40min puis 3 rinçages avec du PBS 1X. Milieu de montage fluorescence : Dako S3023. Lamelles de microscope : 76 x 26 mm.

CFU après 1h et 24h post infection – Lyse des macrophages et étalement des bactéries. 1h et 24h après infection, les plaques 12 puits (3.62 cm²/puits) sont sorties de l'incubateur. Lavage une fois au PBS 1X, puis incubation pendant 5 min avec 500 µL de triton 1%. Lyse des macrophages par aspiration refoulement dans les puits pendant 1 min et grattage des puits pendant 1 min. Dilution de 100 µL de lysat en cascade de 10⁻¹ à 10⁻⁵ dans du LB. Etalement de 100 µL de chaque dilution sur boîtes LB Agar.

Marquage Lamp1. Les macrophages fixés sur les lamelles de microscopie sont perméabilisés 1h à l'aide d'une solution PBS 1X à 0,05 % saponine, 10 % de SVF à laquelle est ajouté l'anticorps primaire anti Lamp1 diluée au 1 : 200 (ABCAM anti-lamp1 ab25245). Les lamelles sont ensuite lavées dans du PBS 0,1 % de saponine. L'anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa Fluor® 647 (Thermofisher® A21235) est ajouté au 1 : 1000 dans une solution PBS à 0,05 % saponine, 10 % de SVF durant 1h dans l'obscurité puis rincé 5 fois dans du PBS 1X.

Marquage Lectin. Les macrophages fixés sur les lamelles de microscopie sont perméabilisés 1h à l'aide d'une solution PBS 1X à 0,05 % saponine, 10 % de SVF durant 1h. Les lamelles sont ensuite lavées dans du PBS 0,1 % de saponine. 25µl de lectine WGA conjugué Alexa Fluor 488 (W11261 Thermofisher) dilué au 1 : 2 dans une solution PBS à 0,05 % saponine, 10 % de SVF sont ajoutés durant 1h dans l'obscurité puis rincés 5 fois dans du PBS 1X.

Marquage des curli : Les macrophages ont été infectés dans des plaques 12 puits avec une MOI de 100 durant 24h puis lavés 1x avec 1 mL de PBS 1X et lysés avec 500 µL de Triton 1%. Le lysat est retiré par centrifugé 1 min 6000 rpm et le culot cellulaire lavé 1x avec du PBS 1X et fixé 30 min avec 500 µL de PFA 3,7 %, puis lavé 2x avec du PBS 1X puis resuspendu dans 200 µL de PBS 1X et déposé sur une lame de polylysine. La lame est lavée par bain de PBS 1X avant ajout de l'Ac anti csgA/B 1 : 1000 (envoyé par Matthew R. Chapman, Université du Michigan), incubée 1h, lavée 2x dans un bain de PBS 1X, puis ajout de l'anticorps secondaire Alexa 645 1h, rinçage 2x dans du PBS 1X et acquisition des images immédiatement après.

Microscopie. Toutes les images ont été acquises à l'aide de l'objectif x60 à immersion sur le microscope inversé Zeiss Axio Imager spinning disk CSU W1 (Yokogawa). Objectif x60 à immersion. Camera ORCA-Flash 4.0 digital CMOS. Acquisition des images sur Le logiciel Metamorph Premier 7.6 software (Universal Imaging). Traitement des acquisitions sur le logiciel Image(J).

Photo-ablation : Les images de photo-ablations ont été acquises à l'aide d'un objectif Plan-APO 60 × / 1,4 NA sur un microscope Ti Nikon enfermé dans une chambre thermostatique (Life Imaging Service) équipée d'une caméra CMOS Flash4.0 V2 (Hamamatsu) couplée à un disque rotatif Yokogawa CSU-X1. Acquisition des images sur le logiciel Metamorph (Universal Imaging).

Test Biofilm *in vitro* : Les précultures bactériennes sont cultivées sur la nuit, en milieu LB à 37 °C, à 180 rpm. Elles sont diluées au 100^{ème} et 150 µl de ces dilutions sont déposés dans des plaques 96 puits pour culture cellulaire en polystyrène (Falcon). Après une incubation de 24h à 37 °C en conditions statiques une mesure de DO_{600nm} est prise au lecteur de microplaques (TECAN M200). Les biofilms sont lavés deux fois dans 200 µl de PBS 1X puis fixés dans 200 µL de la solution de Bouin (Sigma) pendant une heure à 60 °C. Ils sont ensuite lavés 1x dans 200 µL de PBS puis colorés au cristal violet (200 µl) pendant 20 min avant d'être lavés 2x dans 200 µl de PBS. Les biofilms se forment sur les parois latérales des puits. La quantification des biofilms est effectuée après élution avec 150 µL d'éthanol 95 % pendant 30 min et mesure de la DO_{570nm} au TECAN. La quantification de la formation des biofilms est réalisée en utilisant l'indice SBF (specific biofilm formation) calculé comme suit : $SBF = (AB - CW) / G$ où AB est la DO_{570nm} traduisant la formation de biofilm, CW est la DO_{570nm} contrôle (absence de biofilm) et G est la DO_{600nm} des cultures normalisées par celle du milieu seul.

Construction des fusions T6SS GFP par λ red. Même protocole que pour les mutants. L'amplification par PCR avec des amorces flottantes du gène de la GFP et de la cassette Kan est réalisée avec le plasmide pGBMkanGFP comme matrice. Le fragment PCR est ensuite traité par l'enzyme DpnI pour éliminer les restes de plasmide matrice.

Construction de la fusion HU-mcherry dans la souche LF82 contenant le gène 769 fusionnée à la GFP. a) Transformation de la souche 769 fusion GFP avec le plasmide pCP20 : plasmide thermosensible portant une cassette de résistance à l'ampicilline (50 mg/mL) et exprimant la flippase permettant d'éliminer la cassette Kan grâce à une recombinaison des sites FRT. Incubation après transformation à 30 °C pendant 1 heure à 180 rpm puis étalement sur boîte ampicilline 25 mg/mL, incubé à 30 °C une nuit. b) Recombinaison des sites FRT : strie de 8

clones sur boîte LB Agar Ampicilline 25 mg/mL à 30°C ON. Le lendemain strier ces clones sur boîte LB Agar, incubé à 42°C une nuit: cela induit l'expression de la flippase et la perte du plasmide pCP20. Strier sur 3 boîtes LB Agar, LB Amp 25 mg/mL, LB Agar Kan 50 mg/mL à 37°C. Sélection des clones ayant poussés uniquement sur LB Agar.

Tn-seq (transposon inactivation sequencing) : Création d'une banque de 2 millions de mutants LF82 par électroporation du plasmide mariner. Trois infections successives de 24h des macrophages RAW 264.7 (Sigma) ont été effectuées avec cette banque. Les cellules sont lysées 5 min avec du triton 1% puis resuspendu dans 100 mL de LB, puis incubées 12h à 37 °C 180 rpm entre chaque infections. En parallèle 3 cultures in vitro sans passage dans les macrophages ont été faite. Les ADN génomique ont été extraits avec le kit PureLink Genomic DNA mini kit (K182002 ThermoFisher). Préparation des échantillons pour le séquençage avec le protocole de Yoshiharu Yamaichi «Transposon insertion site sequencing for synthetic lethal screening ».

Acquisition STED : Le microscope utilisé est composé d'un STED Expert Line d'Abberior Instruments GmbH couplé à un statif SliceScope de Scientifica, et contrôlé par le logiciel Inspector. L'objectif est un Olympus 100x / 1.4 UPLANSAPO. Les même paramètres d'acquisition ont été utilisés entre chaque images: champ de 30 x 30 µm; pixel size 40 nm/Volume en Z de 5µm avec un pas de 200 nm/Dwell time par pixel de 15µs. Les plans qui ont été fait ont été acquis en deux séquences : la première dans une configuration confocale pour la fluorescence verte et rouge (excitation avec les lasers 485 nm et 561 nm), la seconde dans une configuration STED pour la fluorescence rouge lointain (excitation avec le laser 640, déplétion par le laser 775 nm). La détection a été faite par 3 photodiodes à avalanches, disposant des cubes de filtres permettant de sélectionner la fluorescence verte (500-550 nm), rouge (605-625 nm) et rouge lointain (650-720 nm).

Cryomicroscopie : Les échantillons ont été fixés chimiquement avec 1,5 % de glutaraldéhyde et 1 % de PFA dans du PBS, lavés 2 fois avec du PBS et finalement cryoprotégés avec 10 % de saccharose ou 10 % de dextran dans du PBS. Pour les deux conditions, plusieurs porte-échantillons (cupules en cuivre plaqué or avec une empreinte en forme de dôme de 1,4 mm de diamètre central) ont été doucement remplis avec l'échantillon correspondant. Les cupules ont ensuite été rapidement congelées (vitesse de refroidissement > 20 000 K/s) dans de l'azote liquide par congélation haute pression (2100 bar) avec un appareil Leica HPM100 (microsystèmes Leica). Avec la station de cryopréparation Leica VCT100 et le Shuttle, les

échantillons ont été maintenus congelés pendant les transferts. Avec l'appareil Leica ACE600 (vide poussé autour de 10^{-6} mbar), les échantillons ont été fracturés par congélation à -150°C , gravés par lyophilisation pendant 10 min à -90°C , puis revêtus par pulvérisation cathodique avec 3 nm de platine (à $5,10^{-2}$ mbar et 35 mA dans du plasma Argon). Enfin, des observations ont été effectuées avec un SEM Gemini 500 (Zeiss)

Microscopie électronique biofilm *in vitro* : Les échantillons ont été cultivés sur des puits Ibidi et fixés *in situ* avec la solution de Bouin pendant 30 min puis lavée 2 fois avec du PBS. Les échantillons ont été fixés à nouveau avec 2 % de glutaraldéhyde dans un tampon de cacodylate de sodium 0,10 M (pH 7,4) pendant 20 minutes à température ambiante, suivi d'une attente de nuit à 4°C . Les échantillons ont ensuite été lavés 5 fois pendant 5 minutes avec un tampon de cacodylate de sodium 0,10 M (pH 7,4). Les échantillons ont été postfixés sur glace avec du tétr oxyde d'osmium à 1% pendant 1h dans un tampon de cacodylate de sodium 0,10 M (pH 7,4) puis lavés 3 fois pendant 10 min à l'eau ultrapure. Par la suite, les échantillons ont été déshydratés dans une série d'éthanol (25%, 50%, 70%, 90% avec de l'eau ultrapure, et 2 fois avec de l'éthanol à 100 %, 10 min pour chaque étape). Les fonds des puits Ibidi ont été soigneusement enlevés à l'aide d'une pince à épiler et séchés selon la méthode HMDS (2 fois pendant 10 min avec 100 % HMDS puis 30 min dans une chambre à vide). Les échantillons ont été recouverts de platine 5 nm par pulvérisation cathodique avec un appareil ACE600 (microsystèmes Leica) à $5,10^{-2}$ mbar et 35 mA dans un plasma Argon. Enfin, des observations ont été faites avec un SEM Gemini 500 (Zeiss) à émission de champ fonctionnant dans le vide poussé ($1,10^{-6}$ mbar dans la chambre d'observation), à 3 kV, avec un mode courant élevé et un diamètre d'ouverture de $20\ \mu\text{m}$ (courant du faisceau : 43,2 pA), et une distance de travail de 4 mm.

Partie 7 : Article 1

The Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82 relies on SOS and stringent 2 responses to survive, multiply and tolerate antibiotics within macrophages.

Introduction Article 1

Les patients atteints de la maladie de Crohn présentent une colonisation anormale de l'intestin par des protéobactéries, parmi lesquelles la famille des *E. coli* envahissants adhérents (AIEC) a été caractérisée. Les AIEC se trouvent dans les lésions intestinales chez les patients atteints de maladie inflammatoire de l'intestin tel que la maladie de Crohn. Les AIEC prédominent dans le mucus, adhèrent aux cellules épithéliales, les colonisent et survivent dans les macrophages. La souche AIEC LF82 réside dans des phagolysosomes matures qui créent un environnement stressant (pH acide, stress oxydatif, manque de nutriments, etc.). Cet environnement limite considérablement la croissance d'autres souches d'*E. coli*.

Dans cette partie nous avons caractérisé la croissance de la souche LF82 lors de l'infection des macrophages THP1 dérivés de monocytes humain. Nous avons mis en évidence que durant l'infection, LF82 réalise jusqu'à 6 générations en 24h. LF82 répond tout au long de l'infection aux stress présents dans la vacuole. La colonisation du macrophage dépend de la capacité des bactéries à répondre à ces stress; Nous avons montré que l'adaptation de LF82 passe par la mise en place d'une longue phase de latence d'environ 10h après l'entrée dans les macrophages induite par la carence en nutriment et une phase de replication tardive qui nécessite la réponse SOS pour réparer les dommages. Ces réponses entraînent une grande hétérogénéité dans la population impliquant notamment l'apparition de LF82 tolérants les antibiotiques appelés persistants. La persistance est un phénotype observé chez de nombreuses bactéries pouvant être la cause des infections chroniques. Ce travail a été principalement réalisé en collaboration avec Gaëlle Demarre qui était Post Doc au laboratoire. Mon travail a consisté à mettre en place et à analyser l'adaptation de LF82 avec des rapporteurs fluorescents (Fluorescent dilution, FtsZ-GFP, Biosenseurs, immuno-marquage). J'ai également contribué à l'analyse des phénotypes des mutants générés lors de cette étude. Gaëlle Demarre, elle s'est particulièrement intéressée à la caractérisation du phénomène de persistance. Nous avons collaboré avec Hanna Schenk et Silvia De Monte pour développer un modèle quantitatif de l'infection par LF82.

RESEARCH ARTICLE

The Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82 relies on SOS and stringent responses to survive, multiply and tolerate antibiotics within macrophages

Gaëlle Demarre^{1,2}, Victoria Prudent¹, Hanna Schenk^{3,4}, Emilie Rousseau¹, Marie-Agnès Bringer^{5,6}, Nicolas Barnich⁶, Guy Tran Van Nhieu¹, Sylvie Rimsky¹, Silvia De Monte^{3,6}, Olivier Espéli^{1*}

1 CIRB–Collège de France, CNRS-UMR724, INSERM U1050, PSL Research University, Paris, France, **2** Inovarion, Paris, France, **3** Department of Evolutionary Theory, Max Planck Institute for Evolutionary Biology, Plön, Germany, **4** Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure, Département de Biologie, Ecole Normale Supérieure, CNRS, INSERM, PSL Research University, Paris, France, **5** Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France, **6** Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte, UMR Inserm/ Université d'Auvergne U1071, USC INRA 2018, Clermont Ferrand, France

* These authors contributed equally to this work.

* olivier.espeli@college-de-france.fr



OPEN ACCESS

Citation: Demarre G, Prudent V, Schenk H, Rousseau E, Bringer M-A, Barnich N, et al. (2019) The Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82 relies on SOS and stringent responses to survive, multiply and tolerate antibiotics within macrophages. *PLoS Pathog* 15(11): e1008123. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008123>

Editor: Sophie Helaine, Imperial College London, UNITED KINGDOM

Received: March 15, 2019

Accepted: October 3, 2019

Published: November 14, 2019

Copyright: © 2019 Demarre et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This work has received support from the program «Investissements d'Avenir» launched by the French Government and implemented by ANR with the references ANR-10-LABX-54 MEMOLIFE (GD and OE) and ANR-11-IDEX-0001-02 PSL* Research University (OE), from the ANR (<https://anr.fr>) with the reference ANR-18-CE35-0007 (OE)

Abstract

Adherent Invasive *Escherichia coli* (AIEC) strains recovered from Crohn's disease lesions survive and multiply within macrophages. A reference strain for this pathovar, AIEC LF82, forms microcolonies within phagolysosomes, an environment that prevents commensal *E. coli* multiplication. Little is known about the LF82 intracellular growth status, and signals leading to macrophage intra-vacuolar multiplication. We used single-cell analysis, genetic dissection and mathematical models to monitor the growth status and cell cycle regulation of intracellular LF82. We found that within macrophages, bacteria may replicate or undergo non-growing phenotypic switches. This switch results from stringent response firing immediately after uptake by macrophages or at later stages, following genotoxic damage and SOS induction during intracellular replication. Importantly, non-growers resist treatment with various antibiotics. Thus, intracellular challenges induce AIEC LF82 phenotypic heterogeneity and non-growing bacteria that could provide a reservoir for antibiotic-tolerant bacteria responsible for relapsing infections.

Author summary

Intestinal microbiome dysbiosis has been consistently described in patients with Crohn's disease. The adherent-invasive *E. coli* (AIEC) pathotype in particular, has been implicated in the pathogenesis. AIEC colonize intestinal epithelial cells and survive and replicate within macrophages. Here we demonstrated that growth of AIEC LF82 inside the toxic mature phagolysosome of macrophages requires sequential adaptations and phenotype

and the support of the association François Aupetit (AFA, <https://www.afa.asso.fr>) (OE). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests: Gaëlle Demarre was employed by Inovarion at the time of the study.

switches. First, the stringent response halts the replicative cell cycle of AIEC LF82 for few hours. During this period a large number of AIEC LF82 acquire the ability to tolerate antibiotic treatments. Later when, AIEC multiplication restarts it requires DNA repair suggesting that AIEC have accumulated lesions during the first hours post infection. We observed that non growing bacteria appear frequently from the population of growing AIEC LF82 in this second phase. This raises the proportion of antibiotic tolerant AIEC LF82 up to 10% of the population. Thus, intracellular challenges induce AIEC LF82 phenotypic heterogeneity and non-growing bacteria that could provide a reservoir for antibiotic-tolerant bacteria responsible for relapsing infections.

Introduction

Adherent Invasive *Escherichia coli* (AIEC) strains recovered from Crohn's disease (CD) lesions are able to adhere to and invade cultured intestinal epithelial cells and to survive and multiply within macrophages [1,2]. Attention around the potential role of AIEC in the pathophysiology of CD is growing [3]; however much remains to be learned about the host-pathogen interactions that govern AIEC infection biology. The diversity of virulence factors displayed by multiple AIEC strains suggests that members of this pathovar have evolved different strategies to colonize their hosts [4]. AIEC ability to persist, and in some cases replicate within macrophages is particularly intriguing. Previous work performed with murine macrophage cell lines has revealed that the prototype AIEC strain LF82, multiplies in a vacuole presenting the characteristics of a mature phagolysosome [5,6]. In such an environment, AIEC should encounter acidic, oxidative, genotoxic and proteic stresses. Screening of genes involved in LF82 fitness within macrophage has revealed that HtrA, DsbA, or Fis proteins are required for optimum fitness, [7–9]. These observations confirmed that LF82 encounter stresses in the phagolysosomes. The impact of these stresses on the survival and growth of LF82 inside phagolysosomes has not yet been investigated.

Studies on the bacterial cell cycle of few model organisms under well-controlled laboratory conditions have revealed that to achieve accurate transmission of the genetic information and optimal growth of the population, molecular processes must be coordinated [10,11]. When growth conditions deteriorate, the cell cycle can be modified slightly, as in the case of cell filamentation when genotoxic stress induces the SOS response, or more drastically when sporulation is induced by nutrient deprivation [12]. Such cell cycle alterations affect the entire population. However, under unperturbed conditions, a subset of the population also appears to present a significantly reduced growth rate that allows tolerance to antibiotic treatments. This small portion of the population, typically 1/10000 bacteria, is known as persisters [13–15]. Persisters have been detected for a number of bacteria. They can be found spontaneously in normally growing or stationary phase populations, or they are induced by exogenous stresses or mutations. Significant increase of the proportion of *S. typhimurium* persisters has been observed when these bacteria invade macrophages [16]. Using a fluorescent reporter, it has been demonstrated that these persisters were not multiplying prior to antibiotic addition. Recently, the same tool also revealed the presence of non-growing mycobacteria inside macrophages [17]. Several mediators of persistence have been identified, with toxin-antitoxin modules emerging as key players and the reduction of metabolic activities as the main driver of persistence [18–23]. Persisters are increasingly viewed as a major cause of the recurrence of chronic infectious disease and could be an important factor in the emergence of antibiotic resistance [24]. Tolerance and persistence are similar phenomena of increased survival in the

presence of an antibiotic without an increase in the Minimal Inhibitory Concentration (MIC). However, persistence only affects a subpopulation of cells, whereas tolerance is the general ability of a population to survive longer treatments [25]. Tolerant populations survive the period of antibiotic treatment better, with, typically, a weak dependence on the antibiotic concentration. Physiological states favoring tolerance, such as dormancy, reduced metabolism and ATP levels, have also been identified in persistence. Tolerant cells have some aspect of active metabolism, and their frequency in the population changes when bacterial environmental sensing is altered [26–28]. Persistence is often viewed as the result of a phenotypic switch ensuring long-term adaptation to variable environments, however the origin of persistence and tolerance during infection remain unclear, and their distinction in the context of a host-pathogen interactions is difficult [29].

In the present work, we analyzed growth characteristics of the prototype AIEC strain LF82 in THP1 monocyte-derived macrophages. We observed that stresses within macrophages induce a profound bacterial response that leads to the formation of non-growing and antibiotic-tolerant LF82 bacteria at a high rate through the successive induction of stringent and SOS responses. A portion of non-growing LF82 produced within macrophages is tolerant to antibiotics and presents a survival advantage. Our work revealed that internalization within phagolysosomes curbs bacterial multiplication, and frequent escape from the replicative cycle toward non-growing state(s) is a way to improve long-term survival in the host.

Results

Inside macrophages, LF82 population size increases despite extensive death

We used THP1 (ATCC TIB-202) monocyte-derived into macrophages to monitor the population size of LF82 bacteria over a 24 h period post infection (P.I.) (Fig 1A). Colony-forming units (CFU) measurements revealed that after a long lag the LF82 population increased for 10–14 hours. Considering an exponential growth, the generation time would be $\tau = 0.15 \text{ h}^{-1}$, 0.21 doubling / h. The population reached a maximum at 18–20 h of approximately 5-fold the value at 1 h; the number of LF82 then slightly decreased (reaching 2.5-fold) at 24 h. In this environment LF82 might simultaneously encounter acidic pH [30], oxidative [31] and genotoxic stresses, toxic molecules such as antimicrobial peptides and a lack of important nutrients [32]. Surprisingly, the tolerance level of LF82 to any individual stress did not differ from a K12-C600 *E. coli* in *in vitro* conditions (S1 Fig). Using direct ex vivo Live and Dead labeling, it has been previously proposed that 80% of LF82 present at 24h within macrophages were alive [6]. We observed that this method slightly underestimates dead bacteria inside macrophages because of a weak propidium iodide (PI) labeling (S2A Fig). Live and dead assay performed immediately after macrophage lysis revealed a nearly constant proportion of dead LF82 in the population (20–30%) at 1 h, 12 h, 18h and 24 h post-infection (Fig 1A). THP1 Macrophages eliminate heat killed bacteria with a moderate decay rate of 0.6 h^{-1} (S2B Fig). This rate might be slightly underestimated because heat-killed LF82 differ from bacteria killed within phagolysosomes. We can therefore deduce that dead LF82 observed at 12 h, 18 h or 24 h did not correspond to the accumulation over infection period but rather to the bacteria killed in the last hours before observations. This finding led to consider that LF82 must be under stress attack by macrophages at all times during infection, this permanent stress might explain the important CFU variability that we observed in different infections (Fig 1A and S2C Fig).

LF82 is under attack by macrophages

Using RT-qPCR, we measured the expression of genes induced by the acid (*asr* and *ydeO*), oxidative (*soxS* and *ykgB*), and SOS (*sulA*) responses, and the responses to membrane alteration

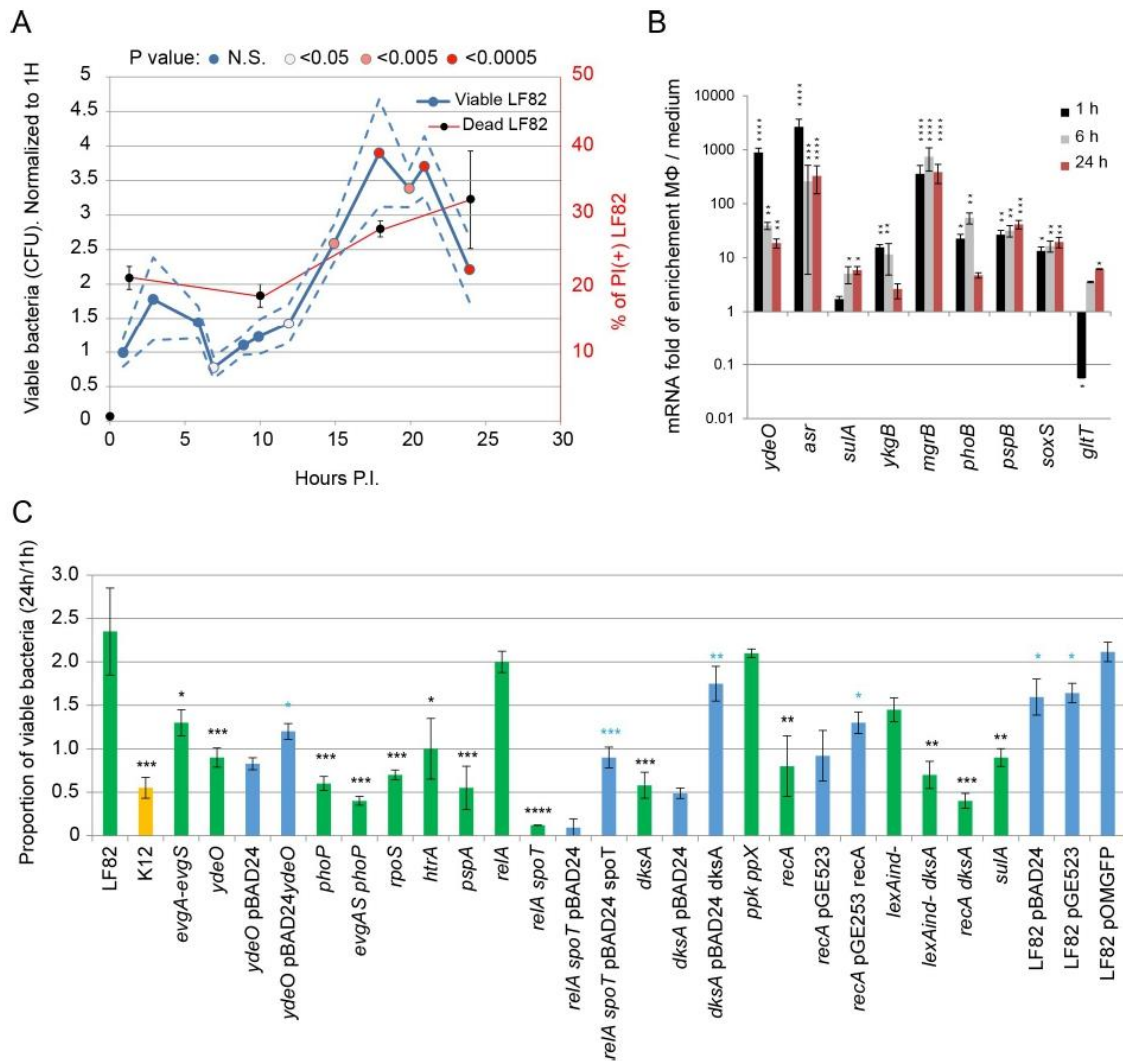


Fig 1. Intracellular LF82 multiplication requires stress responses. A) Measure of viable and dead AIEC LF82 for 24 h post-infection of THP1 differentiated macrophages. Blue circles represent median CFU (blue) \pm Standard deviation (SD) (dotted lines). Individual CFU measurements used to compute the curve are presented on S2A Fig. According to the time point considered between 3 and 12 independent infections were performed. Measure of the propidium iodide (PI) positive dead bacteria (black circles) are plotted on the secondary axis B) Analysis by qRT-PCR of the induction of LF82 stress responses at 1 h, 6 h and 24 h P.I. of THP1 macrophages compared to exponential 3 hours of growth (mid exponential) in liquid medium. Values represent the average of four experiments (3 technical replicates each). The uncertainty of the data was analyzed by measuring the number of standard deviations (σ_{rep}) separating the average induction of each reporter gene (μ_{rep}) with the average induction of the *dxr* control gene (μ_{dxr}): * $\mu_{rep} > \mu_{dxr} \pm 3 \times \sigma_{rep}$; ** $\mu_{rep} > \mu_{dxr} + 10 \times \sigma_{rep}$; *** $\mu_{rep} > \mu_{dxr} + 50 \times \sigma_{rep}$; **** $\mu_{rep} > \mu_{dxr} + 100 \times \sigma_{rep}$. C) Proportion of viable bacteria at 24 h P.I. of THP1 macrophages in comparison to 1 h. LF82, K12-C600 (orange), LF82 deletion mutants (green) and LF82 deletion mutants complemented by a plasmid expression the deleted gene (blue) were infected at a MOI of 30 which corresponds to 0–5 visible bacteria per macrophage at time point 1h (Fig 2A). Values represent the average of 3 to 7 experiments \pm SD. Horizontal lines indicate viability decrease by 2, 5 and 10 fold compared to WT LF82. Data were analyzed using a Student's *t* test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ (black stars correspond to mutant vs WT, blue stars correspond to mutant vs its complementation).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008123.g001>

(*pspB*), the lack of Mg^{2+} (*mgrB*), the lack of phosphate (*phoB*) and the *glT* tRNA gene that is repressed by the stringent response (Fig 1B). Every response pathway was significantly induced

inside the macrophage. The induction of acid and oxidative responses, the response to membrane alterations and to the lack of Mg²⁺ was already high at 1 h P.I., while the SOS response, was only manifest at 6 h and 24 h P.I.. The expression of the *gltT* tRNA was repressed at 1 h P.I. indicating that stringent response is on early in the infection and dissipates at later time points.

Environmental stresses influence LF82 survival

To test the impact of stress responses on the ability of LF82 to colonize macrophage, we constructed deletion mutants of several key regulators of *E. coli* stress pathways and analyzed their survival. Deletion of the acid stress regulators *evgA-evgS*, *phoP* and *ydeO* significantly impacted the ability of LF82 to survive and multiply within macrophages to a level comparable to or even below that of a K12-C600 *E. coli* (Fig 1C). Similar observations were obtained with the *rpoS* (general stress response), *recA* (SOS response), *soxS* (oxidative stress) and *pspA* and *htrA* (envelope damages) deletion mutants. The ppGpp0 strain, *relA spoT* deletions, impaired in the stringent response reporting a lack of nutrients, is the most impacted strain; less than 5% of the initial population survived a 24 h period within macrophages. Survival of the *ydeO*, *relA spoT*, *dksA* and *recA* deletion strains was respectively rescued by the expression *ydeO*, *spoT*, *dksA* and *recA* from a plasmid suggesting that these genes are directly involved in survival. Interestingly, even if the viability of the *recA* mutant was only reduced by two fold compared to the WT strain, we observed that the majority of colonies formed on LB plates 18h after macrophage lysis were 2–4 times smaller than those formed by the WT strain and the *recA* mutant itself without stress. It suggests that RecA and maybe DNA repair are important for the recovery of a normal growth rate following macrophage attacks. These observations confirmed that LF82 encounter severe stresses in the macrophage environment and that its ability to repair stress mediated injuries will determine survival.

SOS and stringent responses severely impacted LF82 survival

Because of their known potential to influence growth and cell cycle parameters we explored the stringent and SOS responses in more details. RecA is the main inducer of the SOS response, which activates nearly 100 genes involved in DNA repair and many others with unrelated or unknown functions, but it is also a crucial to correct DNA lesions by homologous recombination and translesion synthesis [33]. In addition to *recA* deletion, we constructed deletions of *sulA* (division inhibitor) and a mutation in *lexA* (*lexAind-*), which blocks SOS induction in MG1655 *E. coli* and reduces viability in the presence of mitomycin C for LF82 and MG1655 (S3A Fig). We observed that the deletion of each SOS gene significantly decreased the survival of LF82 within macrophages (Fig 1C). Inside the macrophage, survival of the ppGpp0 strain was dramatically impacted. However, this mutant also presented a strong growth defect in liquid culture that complicates interpretation of the macrophage results. To study the impact of the stringent response on LF82 survival and induced antibiotic tolerance, we constructed deletion mutants that might have partial stringent response phenotypes; deletion of *dksA*, encoding a protein linking the stringent response to transcription [34]; and deletion of the polyphosphate kinase and exopolyphosphatase *ppk* and *ppx* [35]. As expected, the *dksA* and *ppk-ppx* deletions had a much less dramatic effect on LF82 growth and survival within macrophages than the *relA-spoT* mutant; nevertheless, the *dksA* mutation significantly impacted the number of live bacteria recovered at 24 h P.I. (Fig 1C). We investigated the ability of LF82 to survive within macrophages when both stringent and SOS responses were altered. We chose to combine *dksA* deletion with *recA* deletion or *lexAind-* mutation. These strains presented a survival defect comparable to that of the single *dksA* mutant (Fig 1C). These

observations demonstrate that surviving LF82 simultaneously or successively require SOS and stringent responses.

Inside phagolysosomes individual LF82 were not homogeneously responding to stresses

Imaging revealed great heterogeneity in the number of LF82 bacteria within individual macrophages. At 18 h or 24 h P.I., many macrophages presented fewer than 5 bacteria, which was comparable to the amount observed at 1 h P.I. (Fig 2A); however, a number of macrophages also presented foci containing up to 50 bacteria (Fig 2B). These observations led us to consider that LF82 were not homogeneously stressed by macrophages. We used GFP fusion with selected stress response promoters to monitor variability of these responses among bacteria and among macrophages (Fig 2B). For acidic, oxidative, SOS and the lack of Mg²⁺ responses we observed GFP positive and GFP negative bacteria at 24 h P.I. As illustrated on Fig 2D, we observed phenotypical heterogeneity even in a single Lamp 1 positive vacuolar environment. We measured the GFP fluorescence as a proxy of stress response induction inside macrophages for the *Pasr* and *PkatG* promoters (Fig 2E and 2F). For both reporters we observed that GFP fluorescence distributed along a 200 fold range at 24 h P.I. The heterogeneity in GFP fluorescence for intracellular bacteria was far larger than that observed for cultures in acidic LB (16 fold) or LB with H₂O₂ (4 fold)(Fig 2G and 2H). At 24 h P.I., we found that approximately 30% of the bacteria had poorly responded to oxidative or acid responses (Fig 2E and 2F). Owing the high stability of the GFP protein that we used in this assay, it is unlikely that this heterogeneity resulted from short pulses of induction separated by long repression periods. The bacteria showing the weaker stress response might actually be dead. To test for this we monitored the ability of LF82 *Pasr-GFP* and LF82 *PkatG-GFP* bacteria to form colonies on LB agarose pad after macrophage lysis (S4 Fig). Although we frequently observed that bacteria with the weakest GFP signal were not able to form colonies, we also observed GFP positive bacteria that failed to divide and bacteria with a weak GFP that restarted growth rapidly. We observed respectively for *Pasr-GFP* and *PkatG-GFP* 30 +/- 15% and 26 +/- 17% of bacteria that are not able to divide within 2.5 h of recovery time. This number is in good agreement with the live and dead assay (Fig 1A). Interestingly this experiment revealed that the lag time before the first division varies from 20 min to 140 min suggesting that LF82 has to repair lesions before returning to growth. We therefore questioned whether heterogeneity in stress response might reflect the coexistence of bacteria in different physiological states and perhaps cell growth or cell cycle regulations.

Macrophages induce the formation of non-growing LF82

We analyzed heterogeneity in LF82 cell cycle within macrophages by using two complementary fluorescence assays. First, Fluorescent Dilution (FD) highlights bacteria that have not divided since the time of infection (Fig 3A and S5A–S5C Fig). FD consists in a plasmid expressing mCherry under a constitutive promoter and GFP under an arabinose inducible promoter. When induction is stopped at the moment on infection the production is stopped and replicating bacteria will dilute GFP at each division; in non-growing bacteria the stable GFP fluorescence is kept for several days. FD provides a likelihood of the cells going through a certain number of divisions. The maximum dilution detectable by the assay in our conditions is 8 generations in LB (S5A and S5B Fig). With this calibration we estimated that a subset of the LF82 population underwent around 5–6 divisions at 24 h P.I. In good agreement with the CFU, measurement of FD showed that only 20% of the population has performed more than 1 division at 6 h P.I. From these observations, we can estimate that the highest generation rate of

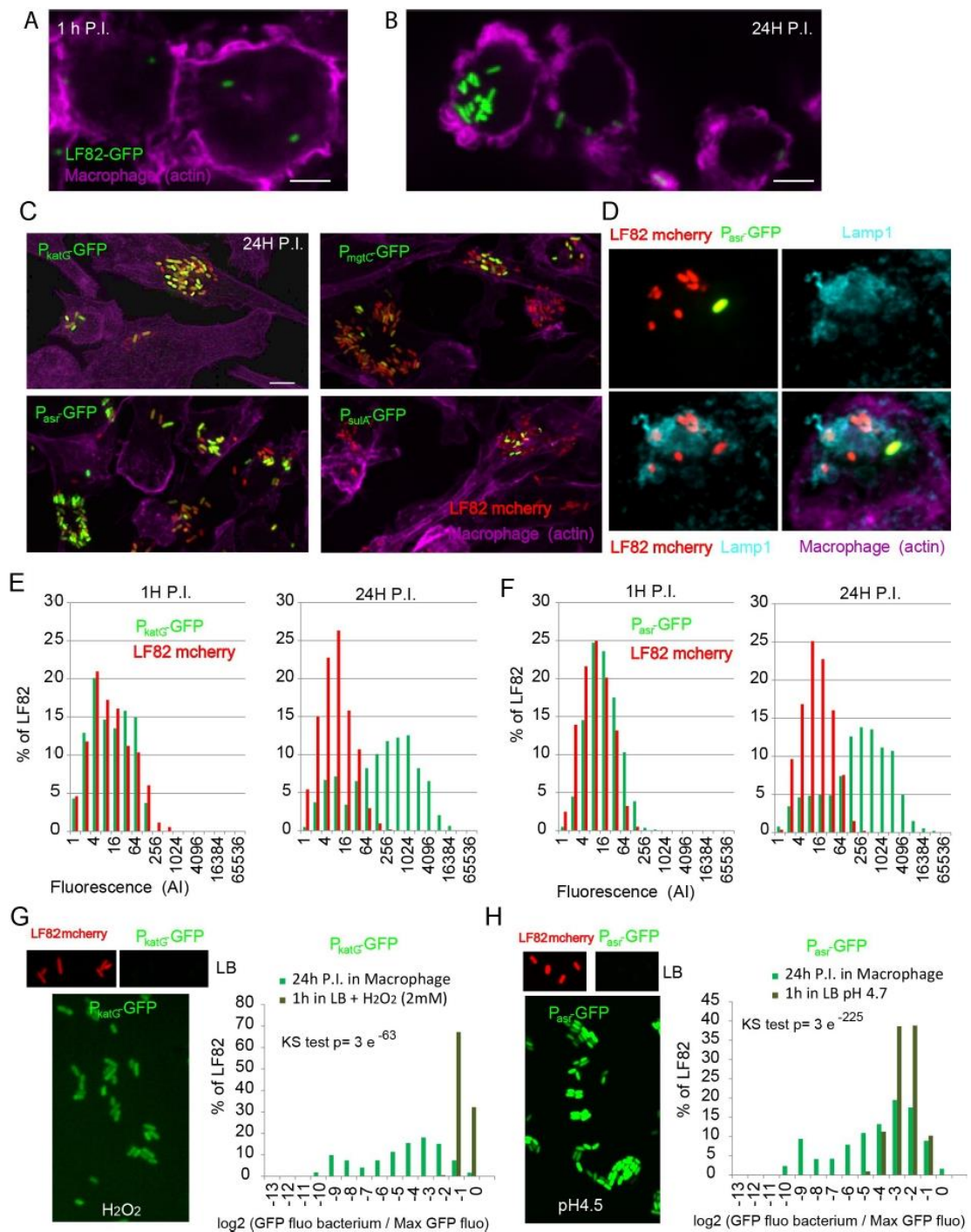


Fig 2. Intracellular LF82 show heterogeneous stress responses. A) Imaging of THP1 macrophages infection by LF82-GFP at a MOI of 30. Representative images at 1 h P.I. Scale bar is 5 μ m. B) Imaging of LF82-GFP at 24 h P.I. C) Imaging of LF82-mCherry stress responses at the single cell level with biosensors. Imaging was performed at 24 h P.I. LF82-mCherry was transformed with plasmids containing either the *katG* promoter fused to GFP (*PkatG*-GFP), the *mgtC* promoter (*PmgtC*-GFP), the *asr* promoter (*Pasr*-GFP) or the *sulA* promoter (*PsulA*-GFP). D) Imaging of LF82-mCherry *Pasr*-GFP and Lamp1 phagolysosome marker. E) Measure of the fluorescence intensity of individual LF82-mCherry

containing the *katG* promoter fused to GFP at 1 h and 24 h P.I. Fluorescence was measured on images acquired on fixed bacteria immediately after macrophage lysis (N = 2000) with a spinning disk microscope F) Measure of the fluorescence intensity of individual LF82-mCherry containing the *asr* promoter fused to GFP at 1 h and 24 h P.I. (N = 2000). G) LF82 *Psula*-GFP, LF82 *PkatGGFP*, LF82 *Pasr*-GFP in LB and 1h after addition of MMC (5μM), H2O2 (5μM) or switched to pH4.7 1h before imaging. Distribution of the fluorescence of LF82 *Pasr*-GFP after 24h post infection in macrophage (from panel B) and after 1 hours of growth in LB buffered at pH4.7. Fluorescence values were expressed as their log2ratio with the average value of the maximum decile (maximum expression). Distributions were compared with a Two-sample Kolmogorov-Smirnov (KS) test.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008123.g002>

LF82 within macrophages is ≈ 0.5 doubling /h between 6 and 20 h P.I. Interestingly, FD also revealed that approximately 4% of the population did not divide or divided fewer than 2 times intracellularly in 24 h (Fig 3A and S5B Fig). By contrast among the small amount of K12-C600 bacteria that survived for 24 h in the macrophage, 60% of K12-C600 bacteria underwent fewer than 2 divisions and less than 10% underwent 5 divisions (S5D Fig). Second, we used TIMER to refine these observations. TIMER is based on the maturation of a mutant version of dsRED,

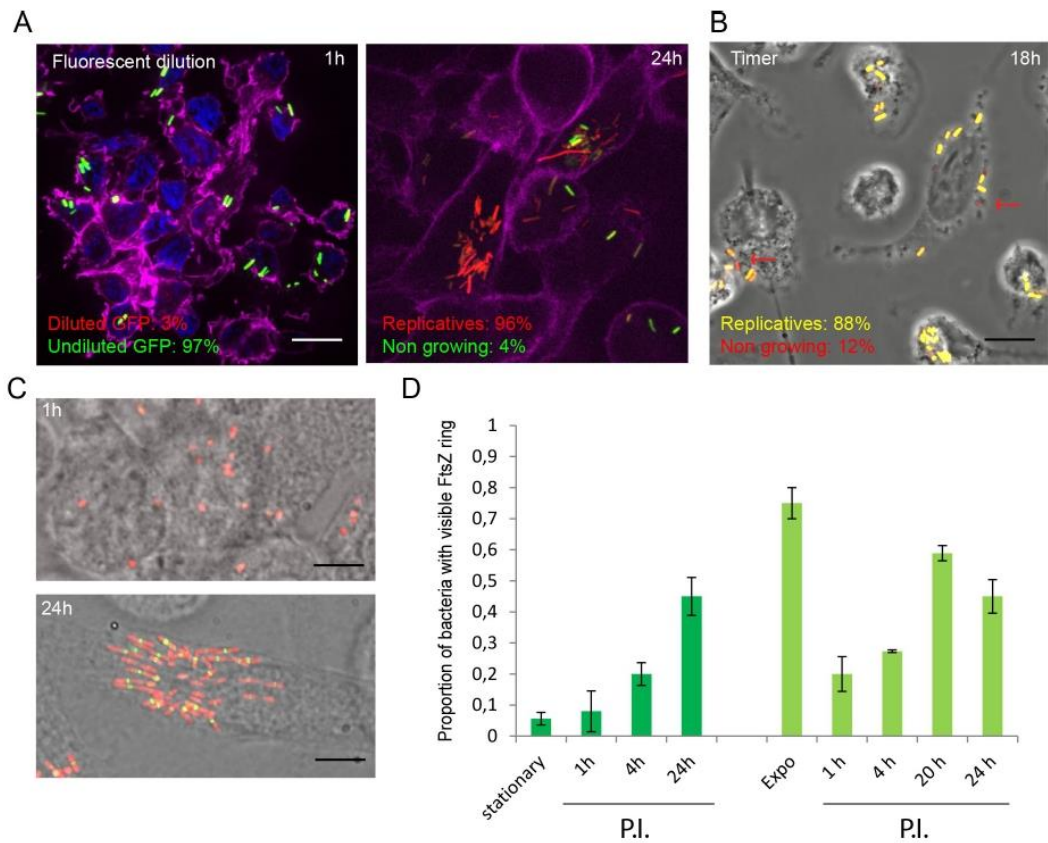


Fig 3. Non-growers LF82 are produced during intracellular growth. A) Representative image of LF82 containing the fluorescent dilution plasmid (pFC6Gi) at 1 h and 24 h post-infection. The frequency of replicative and non-growing LF82 (undiluted GFP) is indicated (N = 300). B) Representative image of LF82 containing the TIMER plasmid (pSC101-TIMER) at 18 h post-infection. The red arrows point toward the reddest LF82. The frequency of replicative and non-growing LF82 is indicated (N = 300). C) Representative images of LF82-mCherry FtsZ-GFP at 1 h and 24 h post-infection. Infections presented in panels A to C were performed with a stationary phase culture of LF82 (O.D. 2). Scale bars are 5 μm. D) Measure of the frequency of LF82 presenting a FtsZ ring in populations growing in LB or within macrophages (N = 300).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008123.g003>

the slow growing bacteria accumulate red fluorescence, and therefore it provides an instantaneous evaluation of the generation time during the infection kinetics (Fig 3B and S6 Fig). TIMER indicated that at 18 h P.I., 10% of the LF82 population was not actively dividing (S6 Fig), supporting the existence of a non-growing or slow-growing subpopulation. Since they require dilution of fluorescent proteins both TIMER and FD are not informative about the first hours of the infection. Therefore, we used a GFP fusion with the septal ring protein FtsZ to monitor division in the individual bacterium (Fig 3C). In LB, exponentially growing LF82 frequently presented the FtsZ ring (70% of the population), but stationary phase LF82 rarely presented the FtsZ ring (<2% of the population, Fig 3D). Following infection of macrophages with stationary phase culture of LF82 *ftsZ-gfp*, we observed that 5% (+/-2) and 40% (+/- 12) of the population, respectively, presented an FtsZ ring at 1 h and 24 h P.I. (Fig 3C and 3D). Following infection with exponentially growing LF82 we observed a sudden reduction in the number of LF82 presenting an FtsZ ring at 1 h, this number is maintained at a low level 4h P.I. (Fig 3D). The three reporters (FD, TIMER and FtsZ) provided complementary indications: i) within macrophages, LF82 strongly slow down their cell cycle for several hours; ii) starting at 6 h P.I. LF82 multiply; in this phase the generation time may vary among bacteria but can be as short as 2h; iii) a part of the population, completely halted their cell cycle and become non-grower. The difference between the number of non-growing LF82 revealed by TIMER and FD shows that non-growing LF82 are formed late in the infection kinetics and not only upon phagocytosis.

Macrophages induce the formation of antibiotic-tolerant LF82

Non-growing Salmonella phenotypes have been observed inside macrophages and during mouse infection [16,36]. Being tolerant to subsequent antibiotic challenge they were recognized as persisters. We inquired whether also for AIEC LF82 the non-growing component of the population had enhanced antibiotic tolerance. In exponentially growing liquid cultures, approximately 0.01% LF82 tolerated a 3 h ciprofloxacin challenge, and can therefore be considered persisters (Fig 4A). Following a brief passage through the macrophage, the frequency of LF82 bacteria tolerant to ciprofloxacin increased to 0.5% (nearly 50 fold compared to exponentially growing LF82). Interestingly the number of tolerant LF82 reached 5% (500 fold compared exponentially growing LF82) after 24 h in the macrophage (Fig 4A). This near to 10-fold increase in the number of tolerant bacteria after a 24 h intracellular infection compared to a 1 h infection indicates that, like non-growers, tolerant phenotypes are not exclusively formed upon infection, but also as bacteria multiply inside the macrophage. In this respect, the behavior of LF82 differs significantly from *S. typhimurium*, which forms a large number of persisters upon macrophage entry, but this population remains stable during the infection [16]. To test if non-growing LF82 revealed by the FD assay indeed corresponded to the antibiotic-tolerant population, we used the macrophage-permeable antibiotic ofloxacin [37]. We added ofloxacin (10x MIC) for 4 h after 20 h of intracellular growth, and we observed significant increases in the proportion of green LF82 (non-growing) inside macrophages (Fig 4B). These observations suggest that the sub-population of non-growing bacteria largely overlaps with that of persisters, where protection from intracellular stresses may also confer enhanced tolerance to antibiotics.

Tolerance to antibiotics is enhanced for LF82 compared with K12-C600 *E. coli*

We compared the tolerance to ciprofloxacin for LF82 and a non-pathogenic K12-C600 laboratory strain following macrophages passages. After a brief passage in macrophages, the

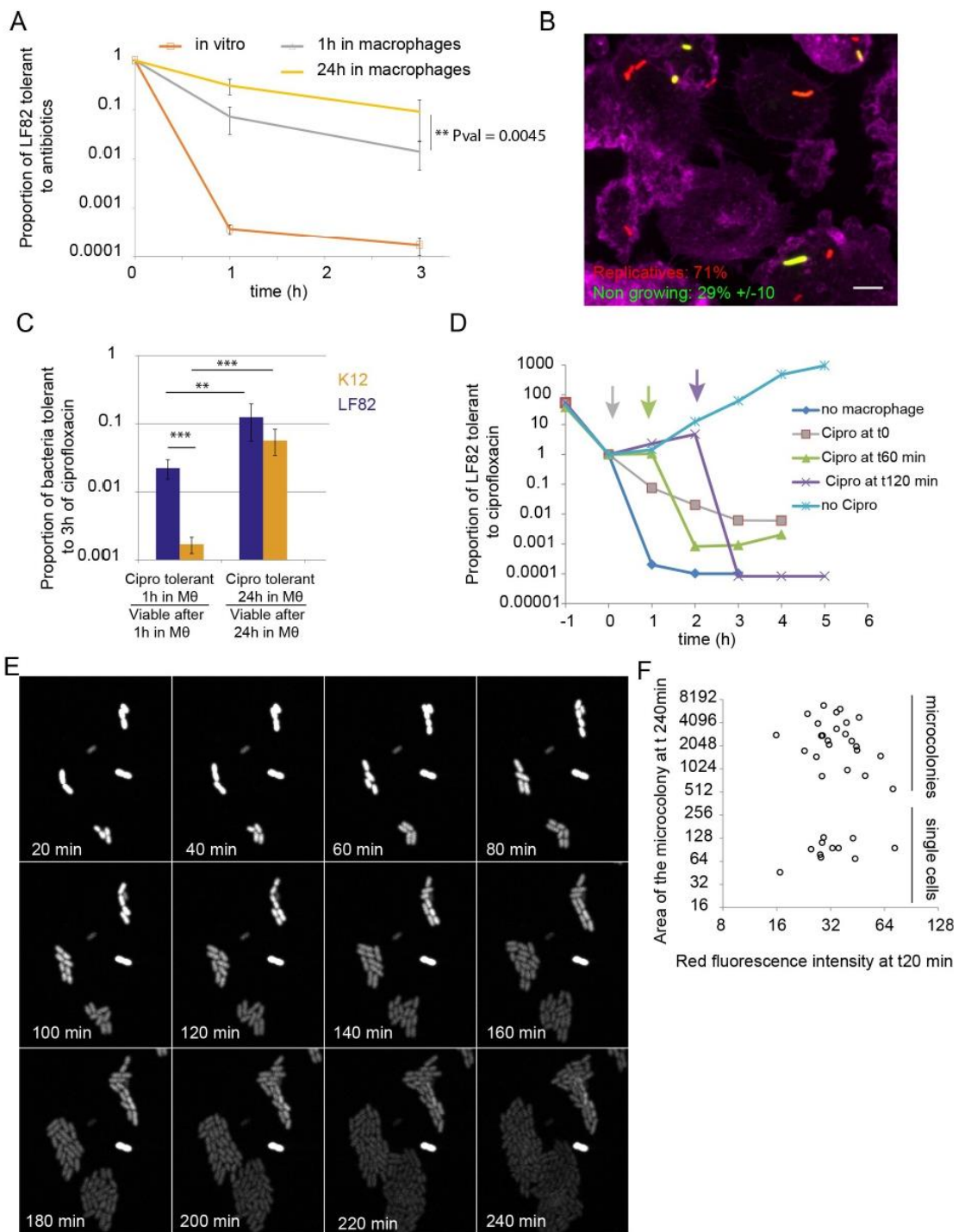


Fig 4. Persisters LF82 are produced during intracellular growth. A) Measure of the proportion of LF82 that were tolerant to ciprofloxacin (10x MIC) at 1 h or 3 h. LF82 were cultivated up to OD 0.3 in LB medium (*in vitro*) or harvested after 1 h or 24 h post infection within macrophages. The challenges exerted on bacteria having spent 1h or 24h through macrophages started immediately after macrophage lysis (see experimental procedures). Data were analyzed using a Student's *t* test to determine differences with the proportion of ciprofloxacin-tolerant LF82 after a 24 h passage compared to a 1 h passage, $**P < 0.01$. B) Proportion of non-growing LF82 (labeled using the Fluorescent

Dilution assay) observed within macrophages (24 h P.I.) following a 6 h ofloxacin (10 μ g/ml) treatment. C) Ratio of ciprofloxacin-tolerant versus viable LF82 and K12-C600 bacteria after macrophage infection. Values are averages of 5 experiments. Data were analyzed using a Student's *t* test to determine differences with the proportion of ciprofloxacin-tolerant LF82 at 1 h post-infection, **P* < 0.05 and ** *P* < 0.001. D) Measure of the proportion of LF82 that were tolerant to ciprofloxacin at 1 h or 3 h with increasing times after macrophage lysis before ciprofloxacin addition. The data presented on this graph are representative of two independent experiments E) Imaging of the regrowth properties of individual LF82-TIMER bacteria after macrophages lysis. Infections were performed for 20 h and then macrophages were lysed, LF82 spread on to LB agarose pads and immediately imaged at 37° C. TIMER red fluorescence was progressively lost as microcolonies formed. The lysis procedure requires 20 minutes before the first field can be observed (t20 min). F) Measure of the ability of LF82 to form microcolonies as a function of red TIMER fluorescence at t20 min of the experiment are presented in E; areas of microcolonies are expressed in pixels².

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008123.g004>

proportion of LF82 that were tolerant to ciprofloxacin was significantly higher for LF82 than K12-C600 (Fig 4C). Even if the absolute number of ciprofloxacin-tolerant K12-C600 was largely reduced compared with LF82, their proportions among bacteria that survived 24 h inside macrophages were comparable (Fig 4C). These findings demonstrate that the number of antibiotic-tolerant bacteria formed in response to macrophage attack is reinforced for LF82 compared with the laboratory strain.

Tolerance to antibiotics is a transient state

We next evaluated whether the antibiotic tolerance was a stable or transient phenotype. We used the macrophage lysis procedure to recover LF82 with induced persistence for 1 h in the macrophage; then, we either challenged them immediately with ciprofloxacin or allowed them to recover in LB for 1 h or 2 h before antibiotic challenge. When bacteria were cultured for 1 h in LB, the frequency of tolerant bacteria was decreased in comparison to bacteria that were immediately treated with the antibiotic; however, this number was still higher than that of bacteria that had not infected macrophages. Two hours in LB was sufficient to cause a comparable frequency of ciprofloxacin-tolerant LF82 to that of bacteria that had not encountered macrophages (Fig 4D). These observations show that when the environment is no longer stressful, antibiotic-tolerant, non-growing LF82 rapidly switch back to a replicative mode.

Characterization of non-growing LF82

To evaluate the proportion of antibiotic persisters in the non-growing population observed with the fluorescence assays, we infected macrophages with TIMER-tagged LF82, lysed the macrophages and allowed bacterial growth on a LB-agarose pad under the microscope at 37° C. Seventy percent of the LF82 bacteria recovered quickly from the challenge and formed microcolonies, but approximately 30% of them never divided (Fig 4E). Some of these non-cultivable LF82 presented non-growing TIMER fluorescence (Fig 4F). The non-growing population is therefore not homogeneous and only a portion of it can contribute to persister formation. A similar observation was described for *S. typhimurium* labeled with FD [16].

SOS and stringent responses influence antibiotic tolerance

Among mutants that affected LF82 survival (Fig 1C), only the *recA*, *relA* *spoT* and *dksA* deletions negatively impacted the number of LF82 that were tolerant to a 3h ciprofloxacin treatment (Fig 5A). The impact of the *recA* deletion might be misinterpreted because ciprofloxacin alters DNA and limits the ability of *recA* persisters to form colonies on LB plates. Therefore, we repeated the tolerance assay with cefotaxime for the following SOS mutants: *recA* (impaired for DNA lesion repair and SOS induction), *lexAind-* (unable to induce SOS) and *sula* (unable to block cell division). *In vitro*, SOS mutants did not present defect for cefotaxime tolerance (S3B Fig). However, these mutants exhibited a decreased tolerance to antibiotics when

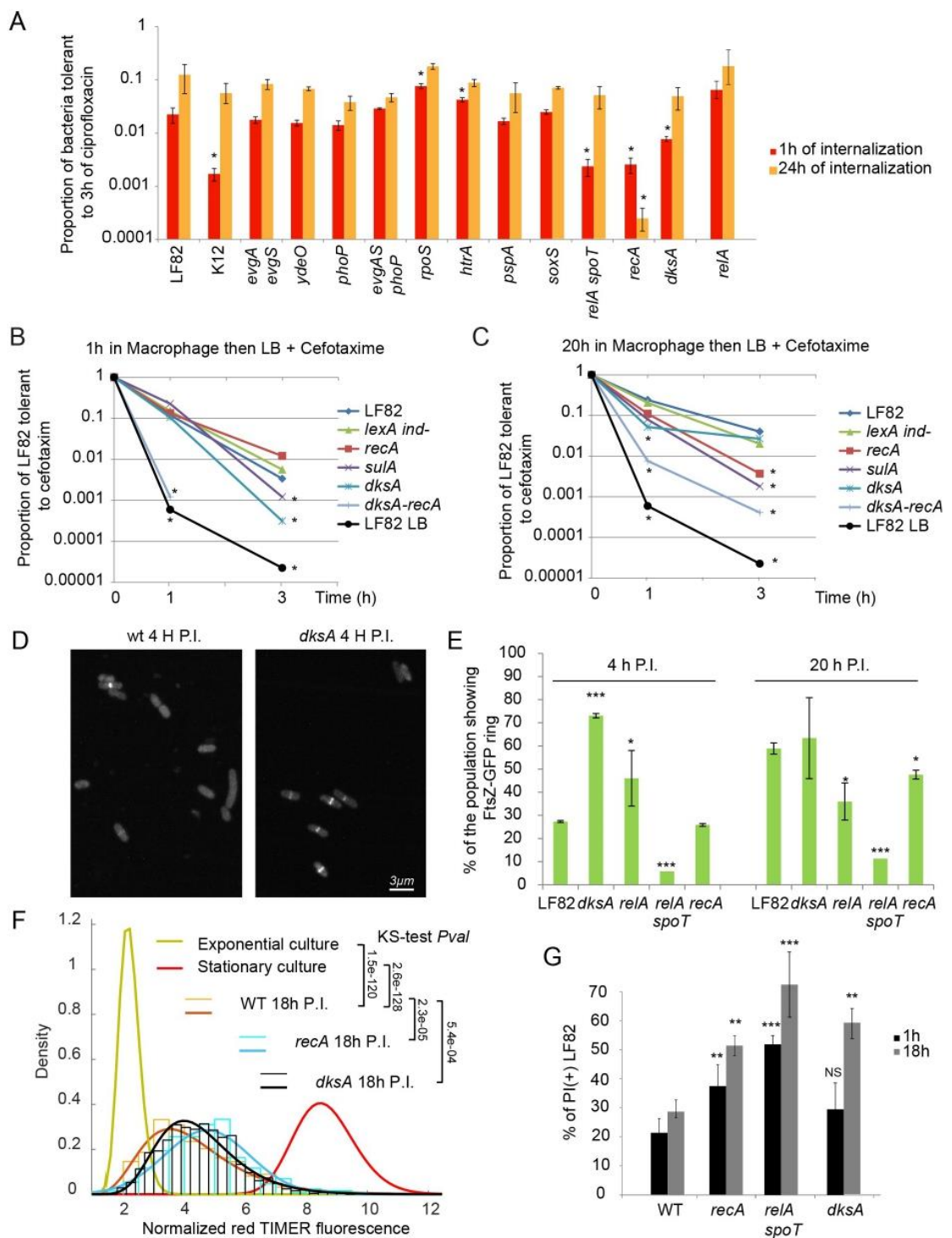


Fig 5. SOS and stringent responses control LF82 cell cycle in the macrophages. A) Proportions of LF82, K12-C600 and LF82 deletion mutants that were tolerant to a 3h ciprofloxacin challenge following a 1h or 24h intracellular period within THP1 macrophages. Values represent the average of 3 to 7 experiments. Data were analyzed by using a Student's *t* test to determine differences compared with wild-type LF82. **P* < 0.05. B) Measure of the proportions of LF82 *lexA ind-*, *recA*, *sulA*, *dksA*, *dksA lexAind-*, *dksA recA* mutants that were tolerant to 3h

of cefotaxim challenge after 1 h of macrophage infection. The 3 h time point was below detection limit for the *dksA recA* mutant because of the poor viability of the mutant in macrophages. Cefotaxime only kills growing bacteria; therefore we resuspended LF82 in LB after macrophage lysis. Under these conditions, we did not observe the plateau observed for persisters to ciprofloxacin, suggesting that tolerant rather than persister bacteria were measured. C) Same as in B but with 20 h of macrophage infection. Values represent the average of 3 to 7 experiments. Data were analyzed using a Student's *t* test to determine differences compared with wild-type LF82. **P* < 0.05. D) Imaging of FtsZ-GFP ring for the WT and *dksA* strains after macrophage lysis 4 h P.I. E) Measure of the number of dividing bacteria (presence of an FtsZ-GFP ring at mid-cell) for the WT, *dksA*, *relA*, *relA-spoT* and *recA* strains after macrophage lysis at 4 h and 20h P.I. N = 3, 300 bacteria were counted for each experiment. Data were analyzed using a Student's *t* test to determine differences with the proportion LF82 cells with a FtsZ ring at each time point, **P* < 0.05 and *** *P* < 0.0001. F) Distribution of red TIMER fluorescence in exponential and stationary phase culture and 18 h P.I. The WT and *recA* and *dksA* mutants were tested during infection. Data are fitted with normal law (thick lines). Data were analyzed two by two with a Kolmogorov-Smirnov tests. G) Live and dead assay performed 1 h and 18 h P.I., in the LF82, LF82*recA*, LF82*lexAind-*, LF82*sulA*, LF82*relAspoT* and LF82*dksA* strains. Data were analyzed using a Student's *t* test to determine differences with the proportion of Propidium iodide (+) LF82 at 1 h and 18h post-infection, ** *P* < 0.001 and *** *P* < 0.0001.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008123.g005>

persisters were induced by a pretreatment with subinhibitory concentrations of ciprofloxacin (S3C Fig). This finding is in good agreement with previous reports [19], and it confirms that SOS induction favors the production of persisters. We analyzed cefotaxime tolerance of these SOS mutants after a 1 h or 20 h period within macrophages (Fig 5B and 5C). We observed a significant reduction of the proportion of *recA* and *sulA* mutants that were tolerant to cefotaxime treatment after a 20 h passage in the macrophage (Fig 5C) but no effect on bacteria that remained only 1 h in macrophages (Fig 5B). The *lexAind-* mutation did not change the number of tolerant bacteria in these conditions. We also analyzed the *dksA* mutant in these assays; surprisingly, it behaved differently than the *recA* and *sulA* mutants: we observed a significant reduction of the proportion of cefotaxime tolerant bacteria following a 1 h passage within macrophages (Fig 5B) but not when the bacteria remained for 20 h in macrophages (Fig 5C). To test an eventual epistatic relation between SOS and stringent response we combined *recA* and *dksA* deletions. The deletion of *recA* exacerbated the impact of *dksA* deletion on the ability of LF82 to become tolerant to cefotaxime after a brief infection (Fig 5B). The deletion of *dksA* exacerbated the impact of *recA* deletion at 20-hour infection (Fig 5C). Our observations suggest that production of persister/tolerant LF82 bacteria is mainly under the control of the stringent response in the first hours of infection but mainly controlled by genotoxic stress, the SOS response and DNA lesion processing later in the infection. When one of these two responses is deficient the rare production of persister /tolerant LF82 requires the other.

The role of SOS response and stringent response for the control of LF82 cell cycle in the macrophages

Knowing that SOS and stringent responses influence the production of antibiotic tolerant LF82 after a passage within macrophage we examined whether they also contributed to LF82 growth control, i.e. production of dividing, non-growing, replicative or dead LF82. We used FtsZ-GFP fusion to measure the number of dividing cells during infection in the *dksA*, *relA*, *relA-spoT* and *recA* mutants. We observed an increased number of cells presenting an FtsZ ring in the *dksA* and *relA* mutants 4 h P.I. (Fig 5D and 5E). This suggests that when stringent response is altered LF82 cannot immediately curb its cell cycle upon phagocytosis. The number of bacteria with an FtsZ ring was really low in the *relA spoT* mutant, we believed this was a consequence of its poor viability (Fig 5E). The Live and dead assay confirmed that the majority of the population is dead when stringent response is completely abolished (Fig 5G). The number of dividing bacteria 4 h P.I. was unchanged for the *recA* mutant (Fig 5E). This is in agreement with the absence of effect of the *recA* deletion on the production of cefotaxime tolerant LF82 early in the infections. At time point 20 h P.I. the percentage of dividing bacteria increased strongly for the WT, increased to a lesser extent for the *recA* mutant and remained

constant for the *dksA* and *relA* mutants. Next we evaluated growth rate in the *recA* and *dksA* mutants with the TIMER tool. The distribution of red TIMER fluorescence was significantly changed for the *recA* and *dksA* mutants compared to the WT strain (Fig 5F). The *recA* deletion shifted the distribution of the population toward red fluorescence (the mean red fluorescence of the *recA* population is 4.7 compared to 4.2 for the WT, KS-test $P = 2.3 \times 10^{-5}$) suggesting that the average growth rate of the population is reduced. This observation is in good agreement with the reduced number of *recA* bacteria presenting FtsZ ring (Fig 5E). In the *dksA* mutant, the distribution was also slightly shifted toward higher amounts of red fluorescence (mean = 4.5, KS-test $P = 5.4 \times 10^{-4}$) compared to the WT (Fig 5E). This suggests that in the absence of DksA the average growth rate is reduced, however in this case this is not correlated with a reduction of the number of bacteria presenting an FtsZ ring (Fig 5E). The proportion of bacteria replicating rapidly is reduced both in the *recA* (11%) and *dksA* (13%) mutants compared to the WT strain (27%) (S6C Fig). The number of bacteria with the highest red TIMER fluorescence, the fluorescence that should correspond to non-growers, is marginally changed in the two mutants compared to the WT strain (S6C Fig). Finally, the live and dead assay showed an increased lethality of the *recA*, *relA*, *spoT* and *dksA* mutants at both time points (Fig 5G) suggesting that, in the macrophage environment, failing growth and division controls will frequently lead to LF82 death.

Altogether our results showed that the stringent response is the main controller of the early intracellular survival of LF82; it limits LF82 cell division in the early phase of the infection, putatively induces the formation of non-growers and among them persists. Later on, when replication is resumed, SOS response grows in importance. DNA lesions that have been accumulated in the lag phase must be repaired to allow replication and formation of new non-growers and new persisters.

Kinetics of macrophage infection

AIEC LF82 tolerates macrophage induced stresses, thus it survives and multiplies in the phagolysosome. The population expansion is accompanied by a rise in the number of bacteria that do not grow and tolerate an antibiotic challenge (called henceforth persisters). The change in time, during macrophage infection, of LF82 population size and fraction of persisters are relevant to future fundamental studies, but also to devising therapeutic strategies involving AIEC or other intracellular pathogens. In order to explore the mechanistic bases of the infection kinetics, we have used a mathematical model (Fig 6A) to fit the observed changes in CFU and persister counts during 24 h for LF82, K12-C600 and the stringent response mutant LF82*dksA* (Fig 6B). The model is based on the following biologically-informed hypotheses (illustrated in Fig 6A and detailed in the Supplementary text 1). i) Reproduction: the population of replicating bacteria B has a constant net growth rate (birth minus death rate) δ_1 , which is either 0 or negative during a lag phase of duration λ , and $\beta > 0$ otherwise. ii) A stress-induced death rate, $\delta_2(S)$ that increases with stress (S). We assume that stress S, possibly due to lesions (DNA lesions, membrane alterations, oxidative damages among others) that accumulate over time or due to a macrophage response to the infection, builds up in time proportionally to the total number of bacteria in the population. iii) Switch to persistence: bacteria have a constant probability k_p of generating non-growing, stress-tolerant phenotypes P. The dynamics of a population of bacteria can be described by a set of three ordinary differential equations for the number B of non-persister bacteria, the number P of persisters, and the stress variable S (Methods). The number of dead bacteria D can be derived from these under the assumption that dead LF82 bacteria decay exponentially with rate 0.56 (computed from the assay in S2C Fig). The model has a total of 12 parameters for the three strains, which are fitted to data as

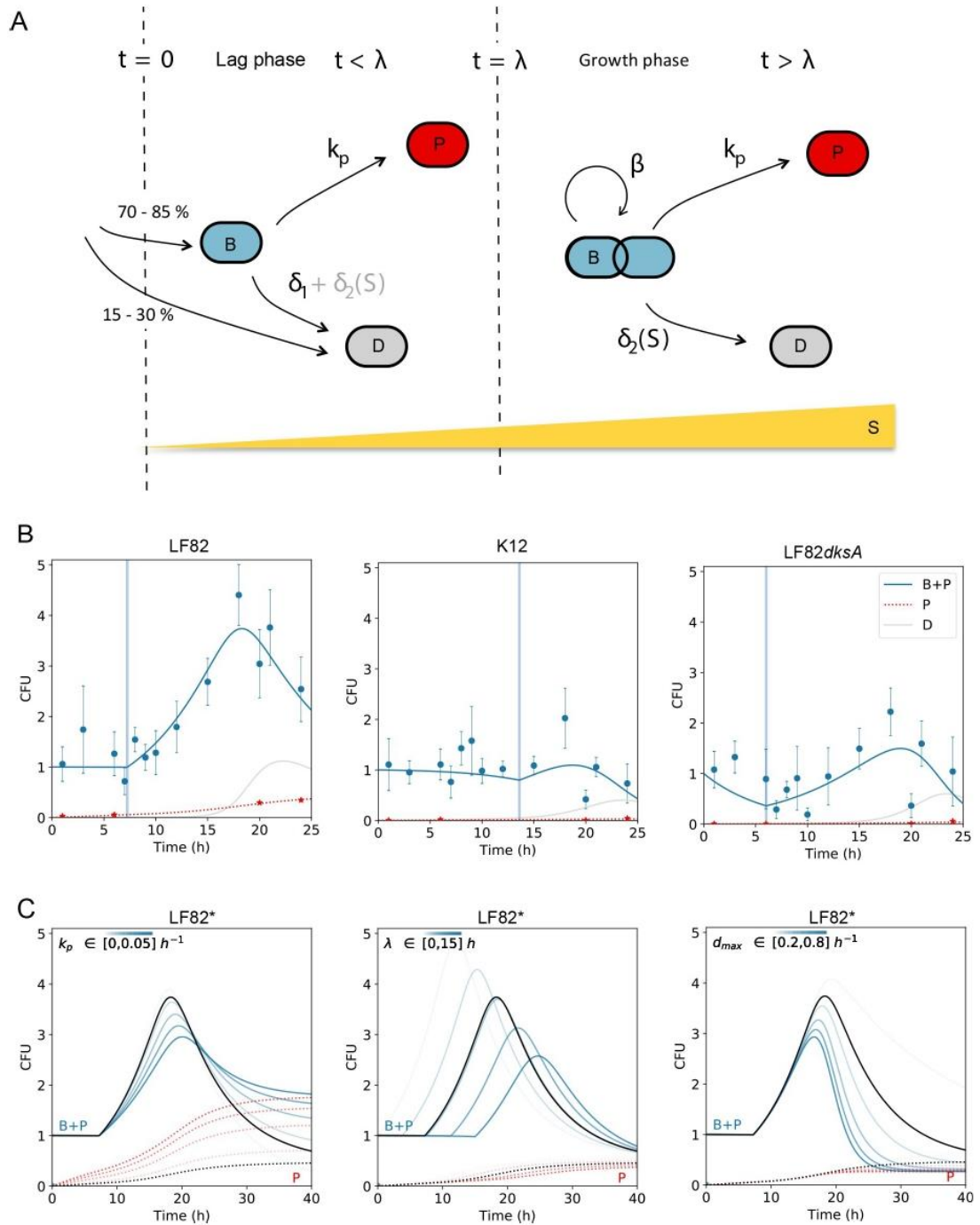


Fig 6. Kinetics of macrophage infection. A) Model of infection of THP1 macrophages by LF82, describing the processes of net growth, switch to persistence and stress-induced death as explained in the text. Part of the cells that enter the macrophage die at the onset of the infection ($t = 0$). During lag phase ($0 < t < \lambda$), death either exactly compensates birth or, in the mutant lacking the stringent response, results in a negative net growth rate $-\delta_1$. Later in the infection, the net growth rate β is positive. Death rate due to stress accumulation (yellow bar) is negligible in the early stages of infection and becomes particularly important at late time points. Bacteria switch to a persistent state at a rate k_p , independent of the growth stage. B) Experimental measures of the infection kinetics (CFUs, circles; persister fractions, stars) collected over 24h for LF82 (this set of data is already presented on the Fig 1A), *E. coli* K12-C600 and LF82 *dksA* (data obtained on one set

of THP1 macrophages in triplicates) and the best fitting parameters (S1 Table) of model eq. (1) (Methods). LF82 data corresponds to the data presented on Fig 1A, *E. coli* K12-C600 and LF82 *dkSA* data are median of 3 to 5 infections per time point. Continuous lines represent total number of bacteria (B+P, continuous line) and persisters (P, dotted line). Vertical lines indicate the duration λ of lag phase. C) Projected changes in infection dynamics for 'virtual mutants' LF82*, obtained by varying k_p , λ and d_{max} —the parameters that quantitatively differ between LF82 and *E. coli* K12-C600—around the LF82 best fit solution (black line); colored lines correspond to parameter values within the indicated interval.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008123.g006>

explained in Methods and S1 Text. Although LF82 displays a considerable overshoot in population size (as also observed in [2]), the dynamics can be reproduced by choosing the same β for every strain. We estimated such net growth rate to $0.15 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$, corresponding to 0.21 divisions per hour (Fig 6B), consistent with independent cell-level measures by FD (S5 Fig). The most notable quantitative difference between strains is that K12-C600 displayed a lag phase of more than 13 h, twice as long as LF82 and LF82*dkSA*. A consequence of this difference is that when K12-C600 bacteria start actively duplicating, stress has already built up. Together with K12-C600's enhanced sensitivity to stress, this curbs the population expansion, resulting in a lower overall growth within macrophages. In the LF82*dkSA* mutant, growth is instead impaired by increased initial mortality (whose rate δ_1 has been estimated by PI measures, S2B Fig), presumably related to stringent response failure. With respect to the other strains, moreover, LF82 is advantaged at later times—when the SOS response becomes important—thanks to reduced stress-induced death rate. Rate of persistence production for LF82 and LF82 *dkSA* (0.08 and 0.002 h^{-1} , respectively) is estimated to be higher than for K12-C600 (0.001 h^{-1}), supporting the notion that AIEC strains within macrophages turn to persisters at an enhanced rate, but less so if their stringent response is impaired. The model allows testing changes in infection dynamics for 'virtual mutants' LF82*, obtained by varying k_p , λ and d_{max} —the parameters that quantitatively differ between LF82 and *E. coli* K12-C600 (Fig 6C). The total population overshoot is enhanced when lag phase is shorter and the effect of stress less acute, but damped when persisters production is more frequent. Interestingly, the phenotypes of the single stress response mutants (acid, oxidative, lack of Mg^{2+}), i.e. reduced CFU at 24 h without perturbation of the persister proportion in the population (Figs 1C and 3A) were nicely reproduced by a change in the single d_{max} parameter. This suggests that the model can be used to plan future works on the effect of mutants or drugs on macrophage colonization by AIEC.

Discussion

We analyzed the growth and survival strategies used by the prototype AIEC strain LF82 to colonize the human monocytes-derived THP1 macrophages. Our analysis revealed that intracellular LF82 are constantly under stress while colonizing macrophages. The consequences of these stresses are important: increase in the death rate of bacteria, slow multiplication of replicating bacteria and formation of a large number of non-growing bacteria. LF82 adapts to this environment thanks to successive phenotypic switches that require the two main stress responses: the SOS response and the stringent response (Fig 7).

Macrophages place LF82 under lethal stress

Using fluorescent reporters, we measured that half of the LF82 population present at 24 h P.I. had given rise to 6 or more generations. Under controlled laboratory conditions, this should produce a 30 to 60-fold increase in the population size at 20 h compared with the 1 h time point PI. However, we only observed a 3 to 6-fold increase in viable bacteria at 20–24 h compared with 1 h. We demonstrated that this modest colonization of macrophages by LF82 is explained by a big death rate and switch from replicative to non-growing cell cycle. At the

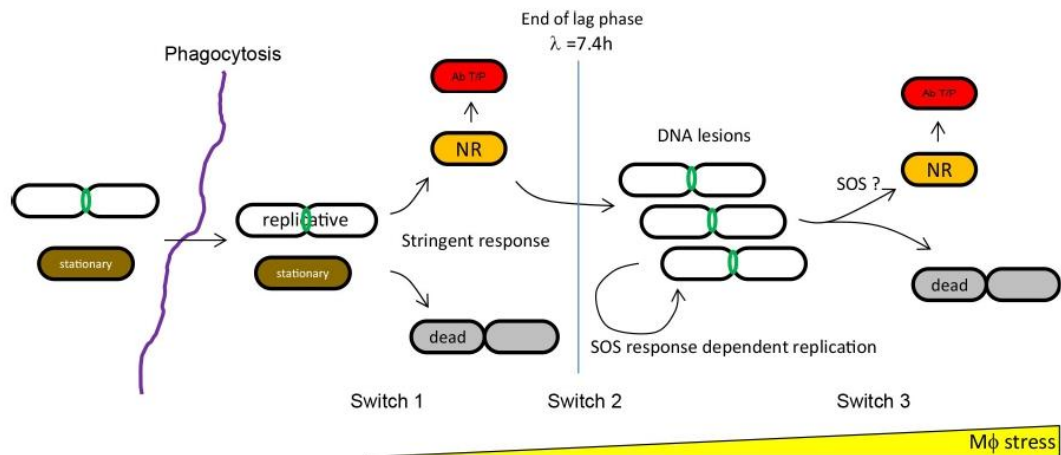


Fig 7. Dynamic of AIEC LF82 bacterial population during macrophage infection. Upon phagocytosis both replicative (green FtsZ ring) or stationary phase (brown) LF82 detect a signal, perhaps nutrient depletion, that led to stringent response activation. This activates a first phenotypic switch toward a non-replicating state (orange) that protects LF82 from dying because of initial stress burst. Among these non-replicating LF82 persisters are formed. After this lag phase, a second switch is required to initiate few rounds of replication. The timing and perhaps the frequency of switching from lag phase to replicative phase differentiate LF82 from our control commensal strain. We have not yet identified LF82 specific determinants that allow this switch. Subsequent replication rounds are dependent on the DNA repair machinery. A third switch, linked to the increasing stress or lesions, is turned on in a portion of the replicative population to form new non growers and persisters. The SOS response might also be playing a role at this stage.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008123.g007>

single-macrophage and single-bacterium level, FD and TIMER fluorescent reporters revealed non-growing LF82. We observed macrophages containing few (less than 4) LF82 with red fluorescent dilution staining. These bacteria had therefore divided several times (>4) before observation and thus should be accompanied by their siblings (>16). This observation is in good agreement with our Live and Dead assay indicating that LF82 progeny has a significant chance to be killed and destroyed by the macrophage. By contrast, some macrophages contained growing LF82 and ultimately acquired more than 50 bacteria in one or several compartments. The live and dead assay confirmed that LF82 was frequently killed by macrophages. Because alterations of bacterial stress responses significantly reduced the bacterial yield, we propose that LF82 death is the consequence of oxidative, acid, genotoxic and protein stresses imposed by the macrophage. We compounded these experimental observations in a mathematical model describing the dynamics of bacterial infection within macrophages. A first phase of stalled growth, a likely combined effect of a prolonged lag phase and of compensation between death and division, is followed by an exponential increase in bacterial concentration. This second phase might correlate with a transient increased permissiveness of phagolysosomes or more likely the adaptation of LF82 to growth in this stressful environment. This expansion is successively curbed by the building-up of stressors. Many persisters are formed in the first phase. However, in the second phase a phenotypic switch to non-growing LF82 will eventually result in a sizeable increase of the persister population. We thus understand the survival of LF82 as a consequence of its ability to adapt to harsh phagolysosome environment both at the entry of the macrophage, by induction of stress responses and particularly the stringent response, and during exponential expansion by SOS response. LF82 advantage over K12-C600 would reside in its ability to exit from the lag phase to perform a few rounds of replication/division before stress becomes too strong (Fig 6). Strategically, early onset of growth is compensated by production of persistent bacteria, which endows the pathogenic strain with long-

term survival in spite of rapid exploitation of the macrophage environment. We have not yet identified LF82 specific regulons, genes or mutations that allow this transition to take place.

Replicative LF82

Fluorescent dilution revealed that after the exit of lag phase LF82 replicated moderately within macrophages, with generation time longer than 2 h. *In vitro*, this would be comparable with generation times observed in minimal medium with poor carbon sources such as acetate. Our observations revealed that within macrophages, 40–50% of the LF82 population presented an FtsZ ring, which is significantly above the number expected from a mixed population of *E. coli* growing with a 2h generation time (28% of cells with FtsZ ring [38]) and non-growing cells. Interestingly, in spite of SulA induction, we did not observe filamentation of LF82 within macrophage. These finding demonstrates that some of the cell cycle rules that were established under defined *in vitro* conditions do not apply to intracellular growth conditions, opening avenues for future investigations of bacterial cell cycle regulation in the context of host infection or the microbiota.

Non-replicative LF82

FtsZ-GFP, FD and TIMER revealed that a significant number of intracellular LF82 were not growing. Using the three reporters allows to propose a scenario for this adaptation. FtsZ-GFP revealed that LF82 switch rapidly from a replicative mode before the infection to a non-dividing or slowly dividing mode within macrophage. This step is kept for the first hours of the infection. FD revealed that approximately 4% of the phagocytosed LF82 immediately halted their cell cycle. TIMER revealed that at 20 h P.I., approximately 10% of the LF82 population was not growing. We also demonstrated that once the macrophages were lysed, a large portion of the LF82 population (from 0.3 to 10%) was tolerant to several hours of antibiotic challenge, and the proportion of non-growers in the population increased in macrophages in the presence of antibiotics. Altogether, these observations suggest that the phagolysosome environment induces frequent cell cycle arrests among the population and that a part of this arrested population is persists or tolerant to antibiotics. Such a phenomenon has been previously described during *S. typhimurium* infection of macrophages [16] or mice [16,36] and is reminiscent of VBNR mycobacteria [39]. Interestingly, we observed an increase in the proportion of macrophage-induced antibiotic-tolerant LF82 at later time points, suggesting adaptive responses to the intracellular microenvironment.

Stress responses are important for LF82 survival within macrophages

As expected for bacteria residing in a toxic environment, stress responses are important for LF82 survival within macrophages. Acidic, oxidative, genotoxic, and envelope alterations, lack of Mg²⁺ and lack of nutrient stress responses significantly decreased the fitness of LF82 (50 to 10% of WT). In a few cases, we demonstrated an additive effect of simultaneously altering two pathways. However, LF82 demonstrated surprisingly good tolerance to these alterations compared with the *in vitro* findings for individual stresses. For example, *recA* deletion mutant was extremely sensitive (<1% survival) to prolonged treatment with genotoxic drugs (S3A Fig); by comparison, in macrophages, despite clear SOS induction, the viability of the *recA* mutant was only reduced by half compared with wild type bacteria. Set aside the possibility that stress-less niches exist due a possible heterogeneity in the macrophage population, the fitness decline of LF82 stress mutants may be limited by a combination of slow growth, formation of non-growers and/or yet uncharacterized adaptation pathways.

Stringent and SOS responses successively control LF82 fate

We investigated the trigger that could allow some LF82 to halt their cell cycle inside macrophages. It appeared to be unrelated to the ability to sense acidic or oxidative stress. At an early time point, stringent response is required to block LF82 division (Fig 5D and 5E). Stringent response mutants show an altered survival and production of antibiotic-tolerant LF82 suggesting that abrupt nutrient starvation is one of the first signals received by LF82 upon phagocytosis. The early stringent response should result in a slowdown of transcription, translation and DNA replication, and therefore, it might provoke the formation of non-growers and a 7-h lag phase. This suggests that the slowing down induced by the stringent response confers a temporary protection that can be extended to antibiotic tolerance when bacteria become persisters. Accordingly the impact of stringent response alteration was less apparent after the lag phase when replication is re-established in a portion of the population of LF82. Our observations that stringent response is crucial to slow down replication and favor the formation of antibiotic tolerant persisters is in good agreement with recent data showing that inhibiting the stringent response blocks *Mycobacterium tuberculosis* entry into quiescence and reduces persistence [40] and the observation that DksA is a common mediator of for persistence to various antibiotics [26]. SOS induction was moderate at 1 h but important at 6 h and 24 h P.I.; this is in good agreement with the lack of an effect of *recA* deletion on the accumulation of LF82 with FtsZ-GFP ring and with undiluted FD GFP. This is also in agreement with the lack of an influence of SOS mutants on the number of LF82 that were tolerant to cefotaxim at 1 h after infection. DNA lesions could, however, form during this period, but they were mostly observed when DNA replication and cell division restarted after 6 h. In this second phase of infection, SOS induction in replicative bacteria might play several roles: i) sustaining DNA repair and therefore DNA replication, cell division and increases in population size; ii) decelerating the division progression, this might be the role of SulA, and thus contributing to the formation of new non-growers; iii) intervening to help the return to growth of non-growers presenting DNA lesions, both within macrophages and after macrophage lysis.

Macrophages as a niche for LF82 survival

The purpose of macrophage colonization by LF82 in Crohn's disease patients is not yet understood. *In vitro*, LF82 colonization did not provoke extensive death of macrophages, which are thus unlikely to serve as a transient replicative niche for ileal infection. Alternatively, we can imagine that dormant LF82 within macrophages can serve as a long-term storage. In this environment, bacteria might be protected from competition with other species of the microbiota and coincidentally from antibiotics. Upon macrophage lysis or inactivation, dormant LF82 would be released and would start to multiply under adequate conditions.

Methods

Strains and plasmids

Deletion mutants (S1 Table) were constructed using the recombineering method as described in [41]. Plasmids are described in S2 Table.

Infection and microscopy

THP1 (ATCC TIB-202) monocytes (5×10^5 cells/ml) differentiated into macrophages for 18 h in phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 20 ng/ml) were infected and imaged as previously

described (Demarre *et al.*, 2017). Infections were performed at MOI 30 (measured by CFU), resulting in the observation of 3 LF82 bacteria per macrophage on average at 1 h P.I. Imaging was performed on an inverted Zeiss Axio Imager with a spinning disk CSU W1 (Yokogawa).

Antibiotic challenge and viable bacterial count using the gentamycin protection assay

To determine the number of intracellular bacteria after 20 min of infection, infected macrophages were washed twice with PBS, and fresh cell culture medium containing 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of gentamicin (Gm) was added for the indicated time (1 h to 30 h). Cell monolayers were washed once with PBS, and 0.5 ml of 1% Triton X-100 in 1x PBS was added to each well for 5 min to lyse eukaryotic cells [5]. Samples were mixed, diluted and plated on LB agar plates to determine the number of colony-forming units (CFU) recovered from the lysed monolayers. For the antibiotic tolerance assays, macrophage lysates were transferred to 5-ml tubes and centrifuged for 10 min at 4100 g. The pellet was either suspended in 1x PBS (t0) and ciprofloxacin (1 $\mu\text{g/ml}$) for 1 h and 3 h, or in LB and cefotaxim (100 $\mu\text{g/ml}$) for 1 h and 3 h. CFU were measured by serial dilution. Tolerance was estimated for the 1-h and 3-h time points as a function of the CFU at t0. For intracellular tolerance assay ofloxacin (10 $\mu\text{g/ml}$) was added for 6h before imaging [37].

Live and dead assay

At the indicated time points, macrophages were lysed with vigorous resuspension in 1x PBS 1% Triton. The cell lysate was pelleted at 300 g for 10 min to eliminate large cell remnants. The supernatant was centrifuged at 4000 g for 10 min. The bacterial pellet was suspended in 1x PBS and processed with the Live and Dead BacLight Viability kit (Thermo Fisher). The bacteria were pelleted for 3 min at 5000 g, resuspended in 50 μl of 1x PBS and spread on a 1% agarose 1x PBS pad for immediate observation.

Measurement of gene expression by RT-qPCR

Total RNA was extracted with TRIzol reagent from 10^6 macrophages infected for 1h, 6h or 24h or 10^7 bacteria grown in cell culture medium for 3h as described in the *Molecular Cloning, a laboratory Manual* (Green and Sambrook, CSH Press). First-strand cDNA synthesis was performed with the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher), and real-time qPCR was performed with SYBR Green Master Mix (Bio-Rad) on a MyiQ real-time qPCR machine (Bio-Rad).

Fluorescence quantification

Custom-made FIJI macros were developed for the analyses of fluorescence. For the Biosensors constitutive expression of mCherry from p-mCherry was used to construct bacterial masks, which were subsequently used to measure GFP intensity. For TIMER analyses, green fluorescence was used to construct the mask. For biosensors and TIMER macrophages were lysed, bacteria were fixed and spread on agarose pad for the imaging. For FD, the analysis was directly performed on infected macrophages; the mean GFP fluorescence of mCherry objects was measured on single Z planes. To limit oversampling of bacteria in dense clusters, only two planes separated by $>2 \mu\text{m}$ were analyzed per field of view. Fluorescence distributions were analyzed with the distribution fitting tool in MATLAB.

Mathematical model for the infection kinetics

A set of three ODEs recapitulates the main features of the observed growth within macrophages, as explained in the main text and in the SI:

$$\begin{aligned} \frac{dB}{dt} &= [1 - I(t < \lambda)]\beta B - k_p B - I(t < \lambda)\delta_1 B - \delta_2(S)B \\ \frac{dP}{dt} &= k_p B \quad (1) \\ \frac{dS}{dt} &= B + P \end{aligned}$$

Here, $I(t < \lambda)$ is the indicator function, which is unitary during lag phase. At the beginning of the infection, thus, the net growth rate $-\delta_1$ is either zero (K12-C600 and LF82) or negative (stringent response mutant LF82dskA). At later times, net growth rate β is instead positive. The stress-induced death rate has been chosen to be a sigmoidal function of the stress level:

$$\delta_2(S) = \frac{d_{max}}{1 + e^{a(S - S_{1/2})}}$$

where the half-saturation stress value $S_{1/2}$ and the sensitivity parameter a are assumed to be identical for all strains. Here stress is an effective variable quantifying the effect of crowding on growth within macrophages, and could correspond both to density-dependent reduction of bacterial growth rate (e.g. due to resource depletion), and to the progressive buildup of macrophage-induced killing.

Fit of the infection kinetics data

Parameters providing the best fit of eqs. (1) to the times series of CFUs and persisters have been obtained by a weighted least-square distance minimization using the python differential evolution algorithm. We used a two-step approach to the fit which allowed us to establish first a subset of 7 parameters (λ and k_p for each strain and β) that shape the lag and exponential phases of growth. Subsequently, we fixed β and the λ s, and fitted the remaining parameters. Details of the fitting procedure are found in the SI, and the results of the fit in [S1 Table](#).

Supporting information

S1 Fig. Measure of the impact of various stresses on LF82 and K12-C600 growth. Growth curves of LF82 (green) and K12-C600 (blue) in LB medium at pH 7.4 and in the presence of serine hydroxamate (15 mg/ml), Serine hydroxamate (7 mg/ml), EDTA (70 mM), in LB at pH 4.7, LB at pH 4.7 in the presence of EDTA (70 mM), with addition of the antibiotics ciprofloxacin (24 ng/ μ l) or cefotaxim (800 ng/ml). Data are the mean of 3 technical replicates. Chemicals or a pH shift were applied at 160 min (red or green traces). (PDF)

S2 Fig. Viability and death assays. A) In situ Live and dead assay on infected macrophages (left panel). A very weak propidium iodide (PI) labeling is observed on putative dead LF82. By contrast strong PI labeling is observed after macrophage lysis (right panels). B) Measure of the speed of disappearance after phagocytosis by macrophages of heat-killed LF82. LF82 were killed by 15 min incubation at 60°C and subsequently labeled with propidium iodide. Labeled dead LF82 were incubated with macrophage at a MOI of 100. Imaging was performed at 1h, 2h, 3h and 24h post infection. SYTO-9 was used to reveal macrophage and eventual live bacteria. The number of dead LF82 per macrophage was measured at each time points. Data are

average of 3 experiments. C) Measure of viable AIEC LF82 for 24 h post-infection of THP1 differentiated macrophages. Open circles represent individual infections, closed circles represent the median CFU (blue) \pm Standard deviation (SD) (dotted lines).

(PDF)

S3 Fig. Impact of SOS mutations on survival and persistence of LF82 strains. A) Measure of the resistance to Mitomycin C (MMC) of LF82, LF82 *recA*, LF82 *lexAind-*, MG1655, MG1655 *recA* and MG1655 *lexAind-*. B) Measure of the tolerance to cefotaxim of LF82 and LF82 *recA*, LF82 *lexAind-*, LF82 *sulA* grown in LB medium to an OD of 0.2. C) Induction of tolerance to cefotaxim by pretreatment with a subinhibitory dose of ciprofloxacin (24 ng/ μ l). The data represent the ratio of the number of bacteria that were tolerant to 3 h of cefotaxim in the presence or absence of ciprofloxacin.

(PDF)

S4 Fig. LF82 regrowth after macrophage lysis. A) LF82 *Pasr-GFP*; B) LF82 *PkatG-GFP*. Macrophages were lysed 20h P.I. and immediately spread on LB agarose pad for imaging. Heat color scale represents the intensity of GFP fluorescence. Green and red arrows respectively indicate dividing and non-dividing bacteria.

(PDF)

S5 Fig. Calibration of the fluorescent dilution assay. A) Growth curve of LF82 pFC6Gi in LB at 37°C. Colored diamonds represent the sampling times analyzed by fluorescence microscopy in the panel B. B) Distribution of GFP fluorescence in the growing population of LF82; GFP fluorescence is expressed as the number of generations (each generation corresponds to a 2-fold decrease in GFP fluorescence compared with the average fluorescence of the fully induced population at t0). C) Distribution of GFP fluorescence in the population of LF82-infecting macrophages. Fluorescence was measured for individual bacteria or small bacterial clusters on single Z planes after macrophage fixation at 1 h, 6 h, 24 h and 48 h post-infection (N = 500). D) Distribution of the GFP fluorescence in the population of K12-C600 bacteria infecting macrophages. Fluorescence was measured for individual bacteria or small bacterial clusters after macrophage fixation at 1 h and 24 h post-infection.

(PDF)

S6 Fig. Calibration of the TIMER assay. A) Scatter plot of green versus red TIMER fluorescence measured for exponentially growing LF82 (green) and for a culture that had reached stationary phase (red). B) Distribution of the red TIMER fluorescence (Arbitrary fluorescence Intensity, AI) measured for exponentially growing LF82 (green) and stationary phase LF82 (red) at 4 h and 18 h post-infection. Curves represent the normal fit of the data. C) Inverse cumulative density function (CDF) of the TIMER red fluorescence distributions presented on the panel B and on Fig 5F. CDF allows to determine the number of fast replicating LF82 and non-growing LF82 for the WT, the *recA* and the *dksA* strains.

(PDF)

S1 Table. Strains.

(DOCX)

S2 Table. Plasmids.

(DOCX)

S1 Text. Mathematical model for LF82 growth and survival within macrophages.

(PDF)

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Laurent Aussel, Emmanuelle Bouveret, Dirk Bumann, Sophie Helaine, Jakob Moller Jensen and Fabai Wu for providing plasmids, biosensors and fluorescent cell cycle reporters. We thank Parul Singh and Xavier de Bolle for careful reading of the manuscript and fruitful discussions and Nicole Quenech'Du for technical help. We are very grateful to the members of the CIRB imaging facility.

Author Contributions

Conceptualization: Gaëlle Demarre, Victoria Prudent, Hanna Schenk, Emilie Rousseau, Silvia De Monte, Olivier Espéli.

Data curation: Silvia De Monte, Olivier Espéli.

Formal analysis: Gaëlle Demarre, Victoria Prudent, Hanna Schenk, Marie-Agnès Bringer, Sylvie Rimsky, Silvia De Monte, Olivier Espéli.

Funding acquisition: Olivier Espéli.

Investigation: Gaëlle Demarre, Victoria Prudent, Hanna Schenk, Emilie Rousseau, Sylvie Rimsky, Silvia De Monte, Olivier Espéli.

Methodology: Gaëlle Demarre, Victoria Prudent, Hanna Schenk, Silvia De Monte, Olivier Espéli.

Project administration: Silvia De Monte, Olivier Espéli.

Resources: Nicolas Barnich, Guy Tran Van Nhieu, Olivier Espéli.

Software: Hanna Schenk, Silvia De Monte.

Supervision: Silvia De Monte, Olivier Espéli.

Validation: Silvia De Monte, Olivier Espéli.

Visualization: Olivier Espéli.

Writing – original draft: Silvia De Monte, Olivier Espéli.

Writing – review & editing: Nicolas Barnich, Guy Tran Van Nhieu, Olivier Espéli.

References

1. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1998; 115: 1405–1413. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70019-8](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70019-8) PMID: 9834268
2. Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, Perruchot MH, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun*. 2001; 69: 5529–5537. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5529-5537.2001> PMID: 11500426
3. Elhenawy W, Oberc A, Coombes BK. A polymicrobial view of disease potential in Crohn's-associated adherent-invasive *E. coli*. *Gut Microbes*. 2018; 9: 166–174. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1378291> PMID: 28914579
4. Tawfik A, Flanagan PK, Campbell BJ. *Escherichia coli*-host macrophage interactions in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014; 20: 8751–8763. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i27.8751> PMID: 25083050
5. Bringer M-A, Glasser A-L, Tung C-H, Méresse S, Darfeuille-Michaud A. The Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. *Cell Microbiol*. 2006; 8: 471–484. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00639.x> PMID: 16469058

6. Lapaquette P, Bringer M-A, Darfeuille-Michaud A. Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell Microbiol.* 2012; 14: 791–807. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01768.x> PMID: 22309232
7. Bringer M-A, Barnich N, Glasser A-L, Bardot O, Darfeuille-Michaud A. HtrA stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent and invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Infect Immun.* 2005; 73: 712–721. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.712-721.2005> PMID: 15664909
8. Bringer M-A, Rolhion N, Glasser A-L, Darfeuille-Michaud A. The oxidoreductase DsbA plays a key role in the ability of the Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 to resist macrophage killing. *J Bacteriol.* 2007; 189: 4860–4871. <https://doi.org/10.1128/JB.00233-07> PMID: 17449627
9. Miquel S, Claret L, Bonnet R, Dorboz I, Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Role of decreased levels of Fis histone-like protein in Crohn's disease-associated adherent invasive *Escherichia coli* LF82 bacteria interacting with intestinal epithelial cells. *J Bacteriol.* 2010; 192: 1832–1843. <https://doi.org/10.1128/JB.01679-09> PMID: 20118249
10. Hajduk IV, Rodrigues CDA, Harry EJ. Connecting the dots of the bacterial cell cycle: Coordinating chromosome replication and segregation with cell division. *Semin Cell Dev Biol.* 2016; 53: 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.11.012> PMID: 26706151
11. Haeusser DP, Levin PA. The great divide: coordinating cell cycle events during bacterial growth and division. *Curr Opin Microbiol.* 2008; 11: 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.008> PMID: 18396093
12. Jonas K. To divide or not to divide: control of the bacterial cell cycle by environmental cues. *Curr Opin Microbiol.* 2014; 18: 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.006> PMID: 24631929
13. Wood TK, Knabel SJ, Kwan BW. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79: 7116–7121. <https://doi.org/10.1128/AEM.02636-13> PMID: 24038684
14. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol.* 2010; 64: 357–372. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306> PMID: 20528688
15. Bigger J. TREATMENT OF STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS WITH PENICILLIN BY INTERMITTENT STERILISATION. *The Lancet.* 1944; 244: 497–500. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)74210-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3)
16. Helaine S, Cheverton AM, Watson KG, Faure LM, Matthews SA, Holden DW. Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science.* 2014; 343: 204–208. <https://doi.org/10.1126/science.1244705> PMID: 24408438
17. Mouton JM, Helaine S, Holden DW, Sampson SL. Elucidating population-wide mycobacterial replication dynamics at the single-cell level. *Microbiol Read Engl.* 2016; 162: 966–978. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000288> PMID: 27027532
18. Rycroft JA, Gollan B, Grabe GJ, Hall A, Cheverton AM, Larrouy-Maumus G, et al. Activity of acetyltransferase toxins involved in *Salmonella* persister formation during macrophage infection. *Nat Commun.* 2018; 9: 1993. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04472-6> PMID: 29777131
19. Dörr T, Lewis K, Vulić M. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* 2009; 5: e1000760. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000760> PMID: 20011100
20. Shan Y, Brown Gandt A, Rowe SE, Deisinger JP, Conlon BP, Lewis K. ATP-Dependent Persister Formation in *Escherichia coli*. *mBio.* 2017; 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.02267-16> PMID: 28174313
21. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science.* 2004; 305: 1622–1625. <https://doi.org/10.1126/science.1099390> PMID: 15308767
22. Harms A, Fino C, Sørensen MA, Semsey S, Gerdes K. Prophages and Growth Dynamics Confound Experimental Results with Antibiotic-Tolerant Persister Cells. *mBio.* 2017; 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.01964-17> PMID: 29233898
23. Amato SM, Fazen CH, Henry TC, Mok WWK, Orman MA, Sandvik EL, et al. The role of metabolism in bacterial persistence. *Front Microbiol.* 2014; 5: 70. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00070> PMID: 24624123
24. Verstraeten N, Knapen W, Fauvart M, Michiels J. A Historical Perspective on Bacterial Persistence. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2016; 1333: 3–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2854-5_1
25. Balaban NQ, Helaine S, Lewis K, Ackermann M, Aldridge B, Andersson DI, et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat Rev Microbiol.* 2019; 17: 441–448. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3> PMID: 30980069
26. Amato SM, Brynildsen MP. Persister Heterogeneity Arising from a Single Metabolic Stress. *Curr Biol CB.* 2015; 25: 2090–2098. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.034> PMID: 26255847

27. Bernier SP, Lebeaux D, DeFrancesco AS, Valomon A, Soubigou G, Coppée J-Y, et al. Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. *PLoS Genet.* 2013; 9: e1003144. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003144> PMID: 23300476
28. Radzikowski JL, Vedelaar S, Siegel D, Ortega AD, Schmidt A, Heinemann M. Bacterial persistence is an active σ S stress response to metabolic flux limitation. *Mol Syst Biol.* 2016; 12: 882. <https://doi.org/10.15252/msb.20166998> PMID: 27655400
29. Kim J-S, Wood TK. Tolerant, Growing Cells from Nutrient Shifts Are Not Persister Cells. *mBio.* 2017; 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.00354-17> PMID: 28420737
30. Huynh KK, Grinstein S. Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 2007; 71: 452–462. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00003-07> PMID: 17804666
31. Wang G. Chloride flux in phagocytes. *Immunol Rev.* 2016; 273: 219–231. <https://doi.org/10.1111/imr.12438> PMID: 27558337
32. Uribe-Querol E, Rosales C. Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens. *Front Immunol.* 2017; 8: 1368. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01368> PMID: 29114249
33. Kreuzer KN. DNA damage responses in prokaryotes: regulating gene expression, modulating growth patterns, and manipulating replication forks. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5: a012674. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012674> PMID: 24097899
34. Sharma UK, Chatterji D. Transcriptional switching in *Escherichia coli* during stress and starvation by modulation of sigma activity. *FEMS Microbiol Rev.* 2010; 34: 646–657. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00223.x> PMID: 20491934
35. Rao NN, Kornberg A. Inorganic polyphosphate regulates responses of *Escherichia coli* to nutritional stringencies, environmental stresses and survival in the stationary phase. *Prog Mol Subcell Biol.* 1999; 23: 183–195. PMID: 10448677
36. Claudi B, Spröte P, Chirkova A, Personnic N, Zankl J, Schürmann N, et al. Phenotypic variation of *Salmonella* in host tissues delays eradication by antimicrobial chemotherapy. *Cell.* 2014; 158: 722–733. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.045> PMID: 25126781
37. Pocardalo J-J. Use of Fluoroquinolones for Intracellular Pathogens. *Rev Infect Dis.* 1989; 11: S979–S984. https://doi.org/10.1093/clinids/11.supplement_5.s979 PMID: 2672263
38. den Blaauwen T, Lindqvist A, Löwe J, Nanninga N. Distribution of the *Escherichia coli* structural maintenance of chromosomes (SMC)-like protein MukB in the cell. *Mol Microbiol.* 2001; 42: 1179–1188. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02691.x> PMID: 11886550
39. Manina G, Dhar N, McKinney JD. Stress and host immunity amplify *Mycobacterium tuberculosis* phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms. *Cell Host Microbe.* 2015; 17: 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.016> PMID: 25543231
40. Dutta NK, Klinkenberg LG, Vazquez M-J, Segura-Carro D, Colmenarejo G, Ramon F, et al. Inhibiting the stringent response blocks *Mycobacterium tuberculosis* entry into quiescence and reduces persistence. *Sci Adv.* 2019; 5: eaav2104. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav2104> PMID: 30906866
41. Demarre G, Prudent V, Espéli O. Imaging the Cell Cycle of Pathogen *E. coli* During Growth in Macrophage. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2017; 1624: 227–236. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7098-8_17 PMID: 28842887

Partie 8 : Article 2

Crohn's disease related bacterium AIEC LF82 assembles a biofilm-like matrix to protect intracellular microcolonies from phagolysosomes attacks

Introduction Article 2

Dans cette partie nous avons mis en évidence un des mécanismes mis en place par les AIEC LF82 pour soutenir leur multiplication dans les macrophages sans détoxifier leur environnement vacuolaire. J'ai observé que LF82 formait une communauté intracellulaire où les bactéries sont organisées et protégées par une matrice exopolysaccharidique. Cette matrice, présente les caractéristiques des biofilms observé sur les surfaces auxquelles E. coli adhère. Dès les premières étapes de l'infection on observe une induction de réponse aux stress entraînant le ralentissement de la croissance de LF82 pendant une période de 6 à 10 heures. Vers la fin de cette étape, nous avons observé l'induction de nombreux gènes impliqués dans la voie du biofilm. La délétion des gènes spécifiques à la formation de biofilm ou une inhibition chimique par l'acide cis-2 décénoïque altère la survie de la bactérie dans les macrophages murins et humains. De plus, ce mécanisme semble stimuler la formation de LF82 tolérant aux antibiotiques.

J'ai également observé que la formation et la survie de la communauté bactérienne apparentée aux biofilms formée dans les macrophages nécessitent l'expression de l'îlot de pathogénicité II codant pour la yersiniabactine, un sidérophore permettant la capture du fer, du cuivre et du nickel.

Ces résultats révèlent une stratégie de colonisation originale mise en place par LF82 pour se multiplier dans un environnement multistressant tel que les phagolysosomes des macrophages. Cette double protection conférée par la formation de biofilm et des persistants associés pourrait contribuer aux faibles succès des antibiotiques dans le traitement de la Maladie de Crohn ainsi que dans la chronicité de la maladie. La mise en évidence de ce mécanisme permet d'envisager la conception d'une stratégie plus efficace pour le traitement des patients visant à la fois les biofilms et les cellules en persistance. J'ai réalisé la grande majorité des expériences présentées dans cet article. Gaëlle Demarre et Maxime Werry du groupe d'Antonin Morillon ont réalisé les expériences de RNA-seq.

Crohn's disease related bacterium AIEC LF82 assembles a biofilm like matrix to protect intracellular microcolonies from phagolysosomes attacks

Victoria Prudent¹, Gaëlle Demarre¹, Emilie Vazeille², Maxime Wery³, Antinéa Ravet¹, Julie Dauverd Girault¹, Nicole Quenech'Du¹, Marie-Agnès Bringer^{2,4}, Nicolas Barnich², Antonin Morillon³ and Olivier Espéli^{1,*}

¹ CIRB – Collège de France, CNRS-UMR724, INSERM U1050, PSL Research University, 11 place Marcelin Berthelot 75005 Paris, France.

² Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte. UMR Inserm/ Université de Clermont - Auvergne U1071, USC INRA 2018, Clermont Ferrand, France

³ ncRNA, Epigenetic and Genome Fluidity, Institut Curie, Sorbonne Université, CNRS UMR 3244, Paris, France.

⁴ Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

Abstract

Patients with Crohn's disease present an abnormal colonization of the intestine by proteobacteria, among these the family of Adherent Invasive E. coli (AIEC) has been characterized in intestinal lesions of patients. AIEC are predominant in the mucus, adhere to epithelial cells, colonize them and survive inside macrophages. We recently demonstrated that AIEC LF82 requires the stringent and SOS responses to adapt to the phagolysosome stresses. This adaption involves a long lag phase during which many LF82 become antibiotics tolerant. Around 10h post infection a multiplication phase is observed allowing the total number of LF82 to increase by 2-5 fold and the appearing of vacuoles with dozens of LF82. In the present work we investigated the mechanism sustaining this multiplication phase. We observed that intracellular LF82 produce an extra-bacterial matrix composed of exopolysaccharides and amyloid fibers that surround each individual LF82. This matrix presents traits of a biofilm and governs the formation of LF82 intracellular bacterial communities (IBC) inside phagolysosomes. We observed that the expression of the High Pathogenicity Island, allowing iron capture by the Yersiniabactin siderophore, is essential for the formation of the IBC and LF82 survival within macrophages. These results demonstrate that AIEC have developed a sophisticated strategy to establish their replicative niche within macrophages, this might have implication to envision future antibacterial strategy for Crohn's disease.

Introduction:

Patients with Crohn's disease present an abnormal colonization of the intestine by proteobacteria, among these the family of Adherent Invasive E. coli (AIEC) has been characterized. AIEC are found in intestinal lesions in patients with inflammatory bowel disease. AIEC are predominant in the mucus, adhere to epithelial cells, colonize them and survive inside macrophages. The mechanisms allowing AIEC adaptation to survival and growth inside macrophages are not yet fully understood. Previous work performed with murine macrophage cell lines has revealed that the prototype AIEC strain LF82, multiplies in a vacuole presenting the characteristics of a mature phagolysosome (Bringer *et al*, 2006; Lapaquette *et al*, 2012). In such an environment, AIEC should encounter acidic, oxidative, genotoxic and proteic stresses. Screening of genes involved in LF82 fitness within macrophage has revealed that HtrA, DsbA, or Fis proteins are required for optimum fitness, (Bringer *et al*, 2005, 2007; Miquel *et al*, 2010a). These observations confirmed that LF82 encounter stresses in the phagolysosomes. However much remains to be learned about the host-pathogen interactions that govern AIEC infection biology. AIEC present various virulence factors which roles in the digestive tract colonization, epithelial cell adherence and invasion and intracellular survival in the phagolysosomes are not characterized yet. The diversity of virulence factors displayed by multiple AIEC strains suggests that members of this pathovar may have evolved different strategies to colonize their hosts (Tawfik *et al*, 2014). However, virulence factors involved in iron capture (High Pathogenicity Island, *chuABCD*, *fhuD* or *sitABCD* systems) present a high prevalence among AIEC strains (Céspedes *et al*, 2017), suggesting that iron capture is a crucial challenge for AIEC strains in one of their ecological niche.

We have recently demonstrated that stringent response (the bacterial check point involved in dealing with nutrient limitation) and SOS response (the bacterial pathway involved in DNA repair) are critical for AIEC survival and multiplication within macrophages. The firing of these two stress responses has for direct consequence to create heterogeneity in the bacterial population with replicating bacteria that contribute to increase population size but with a high death rate and non-replicating bacteria that easily tolerate the stresses. The non-replicative population of LF82 tolerates antibiotics when they are inside a macrophage but also for a significant period of time after macrophage death. These bacteria

tolerating antibiotics are called persisters, they are suspected to be the cause for relapsing of infectious chronic diseases such as tuberculosis or cystic fibrosis.

In addition to persistence, biofilm structures represent another source of antibiotic tolerance. Biofilms are communities of cells attached to surfaces and held together by a self-produced extracellular matrix. The matrix is variously composed of extracellular DNA, protein, and polysaccharide, depending on the bacterial species (Joo & Otto, 2012). Cells in the biofilm state have increased protection against desiccation and harmful substances, including antibiotics and the host immune response (Flemming & Wingender, 2010). Biofilms can attach to diverse surfaces, including, in the case of certain pathogens tissues and less frequently intracellularly. Intracellular biofilm also called intracellular bacterial communities (IBC) have been observed during invasion of urothelial cells lining in the urinary bladder by UPEC bacteria (Anderson *et al*, 2003). In this biofilm state, UPEC evades host defense and persist despite antibiotic therapy. After invasion, UPEC replicate rapidly (doubling times of 30-35 minutes) for up to 8 hours and form a loose collection of hundreds of bacteria (Scott *et al*, 2015). At this point growth rate slows down and UPEC develops pods with biofilm-like traits.

In the present work we have investigated the mechanism allowing LF82 to form micro-colonies inside macrophage phagolysosomes. We have observed that LF82 micro-colonies present IBC characteristics with an extracellular matrix formed of exopolysaccharides and curli fibers surrounding each bacterium. We have demonstrated that genes from the core genome involved in the formation of *E. coli* biofilm are required for the formation of the IBC and for the survival of LF82 within macrophages. We have also observed that IBC confers antibiotics tolerance to LF82. Finally, we have performed genomics screens (Dual RNA-seq and TN-seq) to identify LF82 genes required for the formation of IBCs. We identified the high pathogenicity island (HPI) as an essential element of IBC formation and exopolysaccharide matrix production. These results suggest that iron capture is critical for the construction of LF82 IBC and survival in the particular niche of the phagolysosome.

Results:

AIEC LF82 form organized Intracellular Bacterial Communities (IBC) within phagolysosomes

In the minutes following phagocytosis, the induction of stringent response blocks bacterial cell division and curbs the expansion of LF82 population. This step length for 6 to 10 h and is prone to the formation of LF82 persisters (Demarre et al 2019). When LF82 resumes growth the expansion of the population is dependent on the ability of the bacteria to repair lesions (DNA lesions for example). Bacteria involved in this multiplication stage divide 4-6 times in 10h. This growth phase frequently leads to vacuoles containing more than 20 bacteria within Human THP1 macrophages derived from monocytes and up to hundreds of bacteria in Murine Raw macrophage cell lines (Figure 1A and 1B). To monitor if the formation of large vacuoles only corresponded to the clonal multiplication of one or few phagocytosed bacteria or alternatively to the fusion of different vacuoles, we performed the experiment presented on Figure 1C. It consisted in infecting Raw macrophages successively (1h interval) with GFP tagged LF82 and mCherry tagged LF82. One hour post infection (P.I.) of LF82-mCherry most vacuoles contained only one type of LF82 either green or red. Twenty four hours P.I. a small proportion of vacuoles presented the two types of LF82 (Figure 1C). Surprisingly, we observed that red and green LF82 formed clonal sectors within vacuole. These observations suggest that formation of large vacuoles is not the consequences of multiple fusion events and that LF82 are not free to move within a vacuole. To directly measure the ability of LF82 to move inside a vacuole we used FRAP experiments. Bleaching of several spots inside large vacuoles did not lead to recovery of the fluorescence and demonstrated a strong adherence in between LF82 (Figure 1D and 1E). We deduced that LF82 limited movement allows the formation of colonies within phagolysosomes akin to intracellular bacteria communities (IBC) observed for uropathogenic *E. coli* within bladder cells (Anderson *et al*, 2003).

Transcriptomic analysis of LF82 survival within macrophage

We performed a Dual RNA-seq experiment at 1h and 6h P.I. of THP1 macrophages infected by LF82 to identify if specific transcription programs correspond to the formation of IBC. Experiments were performed in duplicates, around 4 million bacterial and 300 million human reads per sample were collected (Table S1), and DEseq *p* values calculated for each

gene. We first analyzed the bacterial transcriptome. Only genes presenting significant changes in between macrophage and in vitro growth conditions were used for subsequent analysis (p value $<10e^{-10}$). The transcriptomic response to macrophage infection was massive; the expression of 700 and 1000 genes was significantly changed respectively at 1h and 6h post infection (Table S2). At 1h post infection the a majority of genes are down regulated while at the 6h time point both up regulated and down regulated genes are observed. The main upregulated pathways were the response to external stimulus (particularly pH variation and SOS response), the biofilm regulation, the cell communication and organophosphate metabolic process (Table S3). The main downregulated pathways were metabolic pathways including the energetic metabolism, nucleoside phosphate metabolic, carbohydrate metabolism (Table S3). We used data available for *E. coli* K12 on the regulon database (Gama-Castro *et al*, 2016) to identify the key regulators involved in these transcriptomic responses. Regulon database provide relationship insights for 7031 couples of gene and regulator (TF, sigma factors, sRNA), among them the expression of one or both partner is changed in 1400 couples at 6h P.I. The box plot presented on Supplementary Figure S1A illustrates these changes for up regulated genes (green) and down regulated genes (red) for each regulon. Some regulons were mostly (eventually entirely) upregulated or down regulated but many of them present both up regulated and down regulated genes (Supplementary Figure S1B). Among the up regulated, regulons connected to the response to acidic pH are largely overrepresented. They are controlled by EvgA, GadE, GadX, GadW, YdeO, PhoP, BluR regulators and involved 130 genes. In good agreement with our previous observations, genes involved in acid pH response are highly overexpressed as soon as 1h P.I. (Supplementary Figure S1C). The second family of regulons that were up regulated govern the bacterial growing mode (cell division, LPS, capsule or biofilm determinants). Genes in these pathways are controlled by the BluR, CsgD, Dan, DicA, FliZ, McaS, MlrA, MqsA, NhaR, PhoB, OmpR and RcsAB regulators. Among genes controlled by these TFs, we observed, upon entry in the macrophage, a general up regulation of the genes annotated for biofilm and adhesion (Supplementary Figure S1C). In good agreement with this change in the growing style of LF82 at the entry in the macrophage we observed a severe down regulation of the FlhDC regulon that contain motility genes (Supplementary Figure S1C). Biofilm formation frequently corresponds to a switch toward a slower metabolism, this is exactly what RNA-seq data suggested, with a down regulation of genes of

the glycolysis, the ATP production and the purine/pyrimidine metabolism (Supplementary Figure S1C). CsgD and OmpR are the main regulators of the genes dedicated to the formation of the biofilm matrix in *E. coli*; we decided therefore to explore this pathway in details (Figure 1F). We have extracted, from the Mage database (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/mage/index>), every LF82 gene with a biofilm related annotation and plotted their expression level within macrophage compared to the medium in a diagram representing known regulatory interactions between them. We observed that LF82 switches from a planktonic to a biofilm like growth style. Markers of biofilm formation are either up regulated (Curli Fimbriae *csgABCEFG*, colonic acid *wcaABCDEFGHIJKLM* cluster, Poly- β -1,6-N-acetyl-glucosamine *pgaABCD*, major type IV pilin subunit *ppdD*, the capsule genes encoded by Pathogenicity island IV, the biofilm regulators *bssR* and *bssS*, the putative diguanylate cyclase *yliF ycdT yeal*, cyclic di-GMP phosphodiesterase *yahA, ycgG* and *yoaD*) or downregulated (cellulose production *bscABCDEGZ*; major type 1 pilin subunit *fimA*, LPS *rfaCDGFPQ*). Interestingly overexpression of the *pga*, *csg* and *wca* clusters is higher at the 6h P.I. time point compared to the 1h P.I. time point (Supplementary Figure S1C).

Tn-seq reveals that extracellular matrix is under selective pressure within macrophage

We used Tn-seq to identify the important genes for long term survival of LF82 within macrophage. At the most, one phagocytosed LF82 will perform 8 doubling in 24h (Demarre et al 2019). Twenty four hours of infection is therefore too low to observe significant loss of transposon insertions in important genes. Macrophage viability drop after 24h prevented us to increase the duration of infection. Therefore we decided to analyze transposon insertion after three rounds of successive infection and collection of the viable bacteria. We performed two independent Tn-seq experiments; each Mariner library contained approximately 2 millions of independent clones. About 10^6 bacteria from each library were used to infect 10^5 macrophages, intracellular growth was allowed for 24h then macrophages were lysed and bacteria collected and allowed to growth for 12h in LB medium. Genomic DNA was then collected and the bacterial culture was used to re-infect macrophages. We repeated this procedure two times leading to bacterial populations that have spent 24h, 48h or 72h within the macrophage. Preliminary experiments demonstrated that successive LB cultures also imposed a selection on the library. Therefore we performed, for each library,

control experiments with three successive LB cultures. Results were analyzed with the Tn-seq explorer tool (Table S4). We normalized the number of insertions sequenced for each experiment. At the genome level, we did not observe statistically significant difference in between replicate 1 and 2 (Pearson correlation 0.86) therefore we used average of replicate 1 and 2 as indicative value. To identify detrimental insertions in the macrophage infection (3x24h in macrophages + 3x12 h in LB) and in the control experiments (3x12h in LB), we used the ratio of the number of insertions sequenced in each gene in both experiments compared to the library. The control experiment revealed 289 loci where insertions are detrimental (ratio <0.3). Among them we identify genes whose function for optimum growth in LB is well characterized (*ihf, seqA, lon, nuoBCFGHJKMN, ompA ompC, pal, ftsE ftsX, minC, pyrBCEF* and *sapBCDF* Table S4) and 17 LF82 specific genes of unknown function. The macrophage infection experiment revealed 393 loci where insertions are detrimental among them 219 were also detrimental in the control experiment. Therefore we focused our attention on genes that were only under selective pressure because of intracellular growth or on a significantly higher selective pressure within the macrophage compared to successive LB cultures (ratio [3x in macrophages]/[3x in LB] < 0.3). About 180 genes were identified in these categories (Table S4). This group is significantly enriched in transcription factors and for phospholipid transport (Table S5). The observation of previously validated important genes for LF82 survival within macrophage at the top of the Tn-seq hit list (*dksA, rpoS, slyB, degP, pspB-C-F, phoP*, Table S4) and important pathways such as DNA repair (*uvrABC, recO* and *ugd*) or envelope homeostasis (*nlpB-C-D-F, pspB-C-F, degP*) suggested that many Tn-seq hits were genuine important genes for LF82 survival and growth within macrophages. We explored the biofilm pathway in the Tn-seq results. We only observed weak Tn-seq signals for the genes coding for the exopolysaccharide components of the matrix and components of the curli regulon. However we observed strong essentiality signals for regulators of the pathway (*rpoS, dksA, barA, uvrY, rcsB, proQ, ComR, BhsA*) (Figure 1F). Interestingly we also observed Transposon insertions that were positively selected (*rscC, acrR, crp, ompR, bcsAB, bluR*). AcrR, OmpR, BluR are repressors suggesting that expression of the genes they control is beneficial for growth or survival within macrophage (Figure 1F). Altogether genomic assays showed that phagolysosomes favored the induction of the components of an extracellular matrix composed of exopolysaccharides and curli fibers and indicated that alterations of the control of their expression were detrimental for long term survival within macrophages.

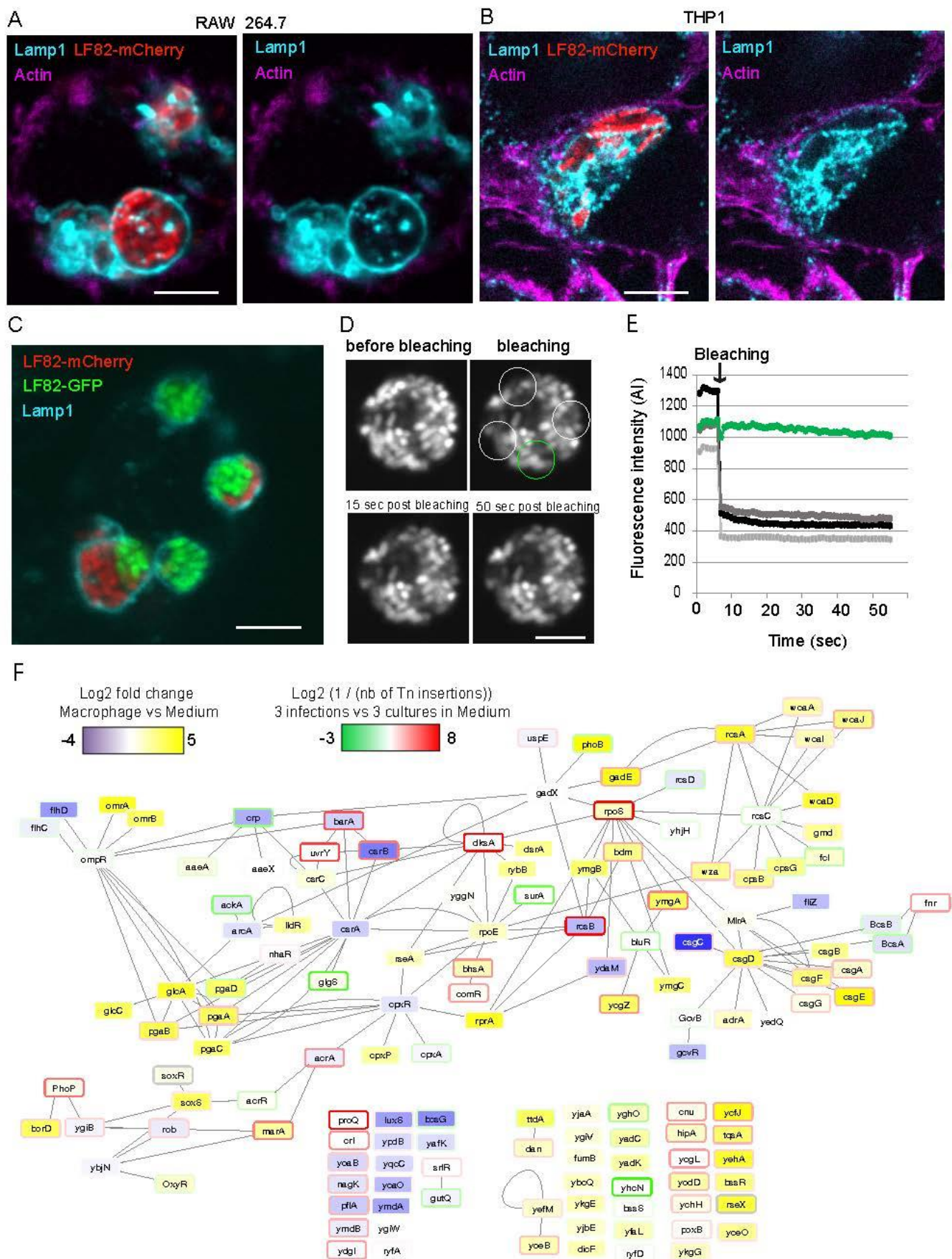


Figure 1: Intracellular LF82 form Intracellular Bacterial Communities inside phagolysosomes. A) Imaging of the phagolysosomes (antibody for Lamp1, Cyan) of Raw macrophages (actin labelling with phalloidin, Magenta) infected by LF82-mCherry (Red) at a MOI of 30 24h P.I.. B) Imaging of the

phagolysosomes (antibody for Lamp1, Cyan) of THP1 macrophages (actin labelling with phalloïdin, Magenta) infected by LF82-mCherry (Red) at a MOI of 30 24h P.I.. Scale bar is 5 μ m. C) Co-infection experiment revealing LF82 clonal clusters formed by the fusion of different vacuoles within phagolysosomes. Raw macrophages were infected first with LF82-mCherry, treated with gentamycin for 1h to remove free LF82-mCherry and subsequently infected with LF82-GFP. 24h P.I. phagolysosomes were labelled with Lamp1 antibody (Cyan) and imaged. Scale bar is 5 μ m. D) FRAP experiments on a LF82-GFP phagolysosomes 24h P.I. White circles outline the bleached regions, green circle outline the control region. Scale bar is 5 μ m. E) Fluorescence quantification of the FRAP experiment presenting in D. F) Cytoscape representation of the network of biofilm related genes organized around the CsgD, UvrY, RcsC and OmpR regulators. Biofilm related genes that do not present direct or indirect links with those regulators are presented at the bottom of the panel. Boxes are filled according to the mRNA fold change of the corresponding gene at 6h P.I. and their border is colored according to the number of Mariner insertions we observed in the Tn-seq experiments, red labeling indicates genes that are important for the survival within macrophages, green labeling indicates genes that create handicap for the survival within macrophages.

IBCs are structured by an extracellular matrix.

Exopolysaccharides matrix can be revealed with fluorescent lectins. Wheat Germ Agglutinin (WGA) and Soy Bean Agglutinin (SBA) revealed the presence of exopolysaccharides in the phagolysosomes (Figure 2A and Supplementary Figure S2). WGA and SBA labeling form envelopes surrounding each bacteria in the phagolysosome. WGA labeling was weak 1h P.I. and manifest in Raw, THP1 and HDMM at time point 24h P.I. (Supplementary Figure S2). In addition we also frequently observed a stronger labeling at the periphery of the bacterial focus colocalized with the Lamp1 labeling. WGA and SBA also revealed many other elements of the macrophage; to probe for the specificity of the WGA labeling we performed a co-infection with a K12 C600 *E. coli*, that is not as efficient as LF82 to multiply within macrophage but form in rare occasion foci of several bacteria (Figure 2C). The WGA labelling is strongly reduced in the C600 vacuoles compared to the LF82 vacuoles (Figure 2C and 2D). Curli fibers can be revealed with antibodies against CsgA or CsgB, unfortunately we could not observe labeling inside macrophage with antibodies (Zhou *et al*, 2013). Therefore we tested them on bacteria recovered from lysed macrophages 24h P.I.. LF82 showed a strong CsgA labelling at its periphery. C600 presented a much weaker labeling (Figure 2D and 2E,

Supplementary Figure S2). We used STED super-resolution microscopy to refine our analysis of the WGA staining in WT LF82 and LF82 deleted of *csgD* the regulator and the *pgaABCD* operon encoding the exopolysaccharides component of the matrix. WGA labeling around bacteria inside the phagolysosomes is observed with the WT strain. By contrast no WGA labeling was observed around LF82 Δ *csgD* and LF82 Δ *pgaABCD* (Figure 2F). The absence of exopolysaccharide matrix in the LF82 Δ *pgaABCD* was expected since this operon directly encodes the enzymes dedicated to its synthesis and export, however the connections between CsgD and exopolysaccharide matrix are not documented in commensal *E. coli* (Parker *et al*, 2017). This might suggest that CsgD is controlling the expression of a LF82 specific essential matrix formation factor. RNA-seq revealed that the expression of *csgD* is highly increased at 6h P.I. (Figure 1D), we took advantage of this to follow the induction of the biofilm pathway overtime. An unstable GFP fusion with the *csgD* promoter revealed that biofilm production is continuous from 6h to 24h P.I. (Supplementary Figure 2D). Our results demonstrate that LF82 forms IBC organized by a biofilm like matrix containing at least exopolysaccharides (poly- β -1,6-*N*-acetyl-D-glucosamine) and amyloid fibrils formed of curlin. The genes allowing the biosynthesis and export of colanic acid, another exopolysaccharides, were also expressed in the phagolysosomes and some of them appeared important (*cpsB*, *wcaJ*, *rcaA*, *wza*, Figure 1F), however we could not detect the presence of colanic acid in the phagolysosome (Supplementary Figure S3A). The genes coding the protein in charge of cellulose biosynthesis and export were down regulated in the macrophage (Figure 1F) and transposon insertions were positively selected in the *bcsG*, *bcsA* and *bcsB* genes (Figure 1F). This suggests that cellulose is not part of the IBC matrix and eventually its presence might be unfavorable for LF82. The absence of cellulose was confirmed by the lack of PNA labeling (Supplementary Figure S3B).

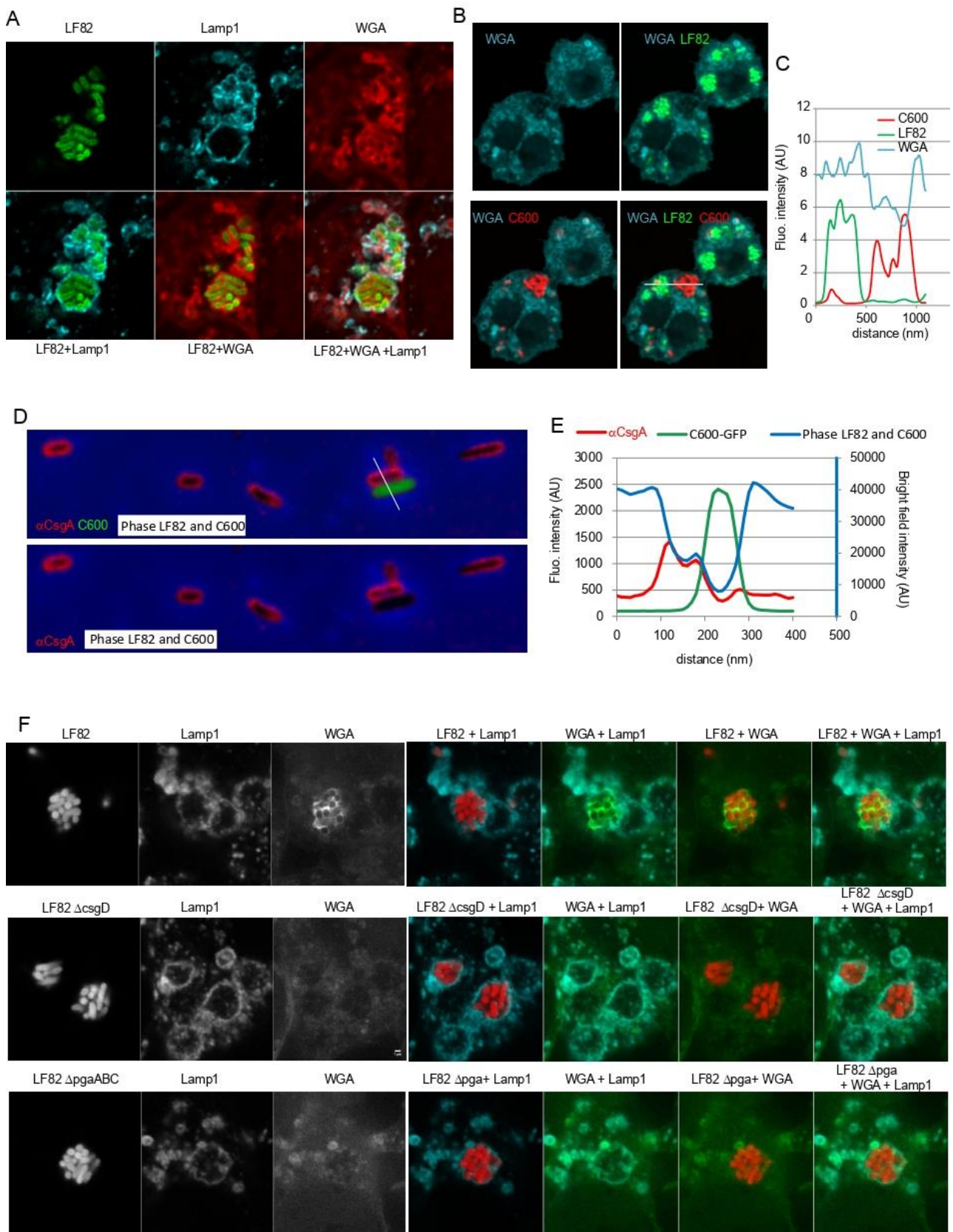


Figure 2: Intracellular LF82 IBCs present a biofilm like matrix. A) Imaging of extracellular polysaccharide structures revealed by wheat Germ Agglutinin (WGA) (Red) labeling around LF82-GFP (Green) inside phagolysosomes (antibody for Lamp1, Cyan) of Raw macrophages. MOI of 30, 24h P.I.. B) Extracellular polysaccharide structures are observed inside phagolysosomes containing LF82-GFP but not inside phagolysosomes containing only C600-mCherry bacteria. C) Quantification of the

fluorescence intensity along the white line drawn in B. D) Imaging of curli fibers (antibody for CsgA, red) formed around LF82 during macrophage infection. Macrophages infected with LF82 and C600-GFP were lysed with Triton 1x 24h P.I. Lysate was immediately fixed with Paraformaldehyde, spread on agarose pads and imaged. E) Quantification of the fluorescence intensity along the white line drawn in D. F) STED super-resolution imaging of the of extracellular polysaccharide structures revealed by wheat Germ Agglutinin (WGA) around LF82 IBCs formed by the WT and the *csgD* and *pgaABC* mutants.

IBC formation is required for LF82 survival within macrophage

We constructed deletion mutants of genes involved in the regulation of the extracellular matrix production (*csgD*, *adrA*, *dgcE*, *pdeH*, *ompR*), in the structural components of the matrix (*pgaA*, *wza*, *waaL*, *bcsB*, *rscCBD*, *glgCAP*) and in the adhesion to the surface (*fimH*, *qseBC*). We tested the ability of these mutants to form biofilm on abiotic surface of 96 well polystyrene plates. Most single mutants presented a clear defect in their ability to form biofilms (Supplementary Figure S4); however they maintain a higher biofilm formation capacity than C600 laboratory strain. The *pdeH* and *fimH* mutants were severely affected confirming that cyclic di GMP regulation and adhesion are required for the formation of the biofilm. We then tested some of these mutants for their ability to survive 24h within Raw, THP1 and Human Monocyte-Derived Macrophage (HMDM) from blood (Figure 3A-3C). In the Raw macrophage viability is 50 % reduced for most of the mutants. In the THP1 macrophages, viability is also reduced but to a lesser extent. Finally, in the HMDM the viability of the *csgD* mutant is also significantly reduced. One important aspect of LF82 survival within macrophages is the formation of non-growing bacteria immediately upon infection under the control of stringent response and during the replicative stage (Demarre et al 2019). These non-growing bacteria are also tolerant/persisters to antibiotics. The *csgD*, *wza* and *pgaABCD* mutants presented a significant reduction of the number of persisters to ciprofloxacin at 20h P.I. but did not influence their number in LB culture. This suggests that IBC is an important element of LF82 infection program.

The extracellular matrix determines the formation of IBC

To test if the matrix is a determinant for the ability to form replicative foci within macrophage, we observed the presence of replicative foci the *csgD*, *pgaA*, *wza*, *glgCAP* mutants (Figure 3E and 3F), the four mutants significantly reduced the proportion of large replicative foci in the mono layer. This suggests that the biofilm matrix is essential for the development of LF82 IBC. To further test the impact of IBC on the survival of LF82 we used Cis-2 decenoic acid, a well described inhibitor of biofilm formation and stability. We observed a reduction of the WGA intensity around LF82 suggesting a reduction in the amount of exopolysaccharides in the matrix (Figure 3G) and concomitantly we observed a reduction of LF82 survival within macrophage (Figure 3H). The survival of the LF82 *csgD* mutant was not affected by Cis-2 decenoic acid, confirming that the drug targets the biofilm matrix. Altogether our results demonstrate that the IBC structure formed within phagolysosomes is beneficial for LF82 survival in macrophages.

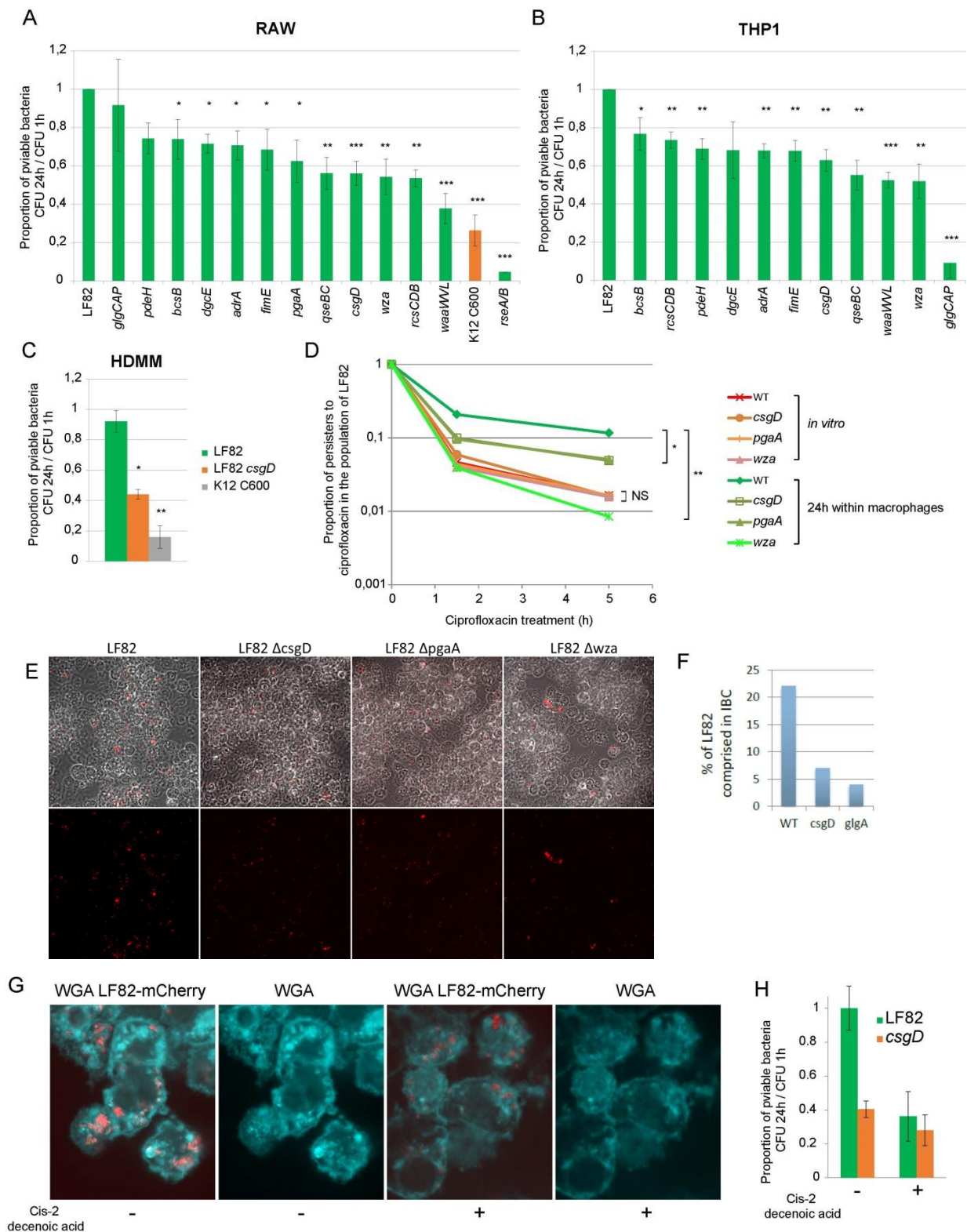


Figure 3: Deletions of the genes involved in the synthesis of the extracellular matrix curb LF82 survival and antibiotic tolerance. A) Proportion of viable bacteria at 24 h P.I. of Raw macrophages in comparison to 1 h. LF82 and LF82 deletion mutants (green) and K12-C600 (orange) were infected at a MOI of 30. Values represent the average of 3 to 7 experiments \pm SD. Data were analyzed using a Student's t test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. B) Proportion of viable bacteria at 24 h P.I. of THP1 macrophages in comparison to 1 h. Data were analyzed as in A. C) Proportion of viable LF82, LF82 *csgD* and K12-C600 bacteria at 24 h P.I. of Human Derived Macrophages from blood

*Monocytes (HDMM) in comparison to 1 h. Data were analyzed as in A. D) Measure of the proportion of LF82 that were tolerant to ciprofloxacin (10x MIC) at 1 h or 5 h. LF82 were cultivated up to OD 0.3 in LB medium (in vitro) or harvested after 1 h or 24 h post infection within macrophages. The challenges exerted on bacteria passaged through macrophages started immediately after macrophage lysis. Data were analyzed using a Student's t test to determine differences with the proportion of ciprofloxacin-tolerant LF82 after a 24 h passage compared to a 1 h passage, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. E) Imaging of IBC formed at 24h P.I. with LF82-mCherry, LF82 *csgD*, LF82 *pgaA* and LF82 *wza* mutants. F) Distribution of IBC volume in the strains. G) Inhibition of the exopolysaccharide matrix synthesis by the addition of cis 2 decenoic acid at 6h P.I., imaging was performed at 24h P.I. H) CFU of LF82 and LF82 *csgD* mutant in the presence of cis-2 decenoic acid in the medium.*

LF82 genes involved in macrophage survival

To monitor the formation of extracellular matrix and design mutants for viability assays we took advantage of the huge biofilm literature developed with the study of laboratory *E. coli* strains. However we observed a clear difference in matrix formation and survival between LF82 and K12. Some of LF82 genes, absent from K12 genome, might be responsible for this difference. The genome of LF82 contains 925 genes that are not present in the genome of *E. coli* MG1655, among them 122 are encoded by the pLF82 plasmid. We took advantage of the RNA-seq experiments to screen for putative IBC activators. Many LF82 genes were upregulated during infection, 172 (26 encoded by pLF82 genes) of these genes were upregulated 1h post infection and 205 (46 encoded by pLF82) were upregulated 6h post infection. Only 25 (3 from pLF82) and 42 (2 from pLF82) LF82 genes were downregulated respectively 1h and 6h P.I.. This was in sharp contrast with the core genome where a majority of genes were down regulated in the macrophages (Table S1). This suggests that some of the LF82 genes might have been selected for intracellular growth and eventually adaptation to macrophage. To reduce this list of putative candidates we combined RNA-seq results with Tn-seq (Figure 4A); putative candidates should be overexpressed and present a significant growth disadvantage over the 3 infection cycles as did transposon insertions in the *csgA,C,D,F,G* genes for example. Three gene clusters emerged from this analysis: the Pathogenicity island II (also called High Pathogenicity Island, HPI, in other pathogens), a putative Type 6 Secretion System (T6SS) and a putative sugar metabolism gene cluster. HPI expression is induced at 6h P.I. but not at 1h P.I. (Figure 4B), this is in good correlation with *csgD* expression and the appearing of the exopolysaccharide

matrix (Supplementary Figure S2). By contrast over expression of the Phospho glucoside and T6SS clusters was observed as soon as 1h P.I. (Supplementary figure S5). We focused therefore our analysis on the HPI which functioning in *Yersinia pestis* has been well characterized. HPI allows the production of a siderophore called yersiniabactin, its export and its reentry in the bacteria when Iron has been captured. The Yersiniabactin is a small peptide synthesized by non-ribosomal peptide synthases encoded in the island (*irp1* and *irp2* genes). Tn-seq revealed that insertions inside *irp* genes were counter selected in the first round of infection but not when LF82 has been submitted to three rounds of selection. By contrast the *ybtP* and *ybtQ* genes coding for the ABC transporter dedicated to the import of Fe³⁺-Yersiniabactin were under selective pressure after 3 infections (Figure 4C). This suggests that the main selective pressure is on the import of iron and not on a potential protective role of iron chelation by Yersiniabactin inside phagolysosome.

The HPI and biofilm metabolism present an intricate relationship.

HPI is composed of two divergent open reading frame controlled by single AraC like regulator (LF82_p299). Genes coding for *ybtS*, *ybtX*, *ybtQ*, *ybtP* are on the Crick strand and genes coding for *ybtA* (the regulator), *irp1*, *irp2*, *ybtU*, *ybtT*, *ybtE* and *fyuA* (the outer membrane receptor of Fe³⁺-Yersiniabactin) are on the Watson strand. We did not succeed in deleting the entire island (32 kb) but deleted the left part of the island from *ybtS* to *irp1*. Viability in Raw, THP1 and HMDM is affected by the deletion of HPI (Figure 4D). We observed that number and size of replicative foci is strongly reduced with the HPI mutant strain, and the remaining foci did not present WGA labeling for exopolysaccharides around bacteria (Figure 4E, Supplementary figure S6). To monitor if biofilm formation also impact iron capture by LF82 we constructed a plasmid reporting the expression of the HPI promoter with an unstable GFP (P-HPI-GFP*). The expression of HPI started, as expected from RNA-seq data, at 6h P.I. and it is manifest at 24h P.I. (Figure 5A). At 24h P.I., HPI expression is bimodal with bacterial foci strongly expressing HPI while others were not (Figure 5A -5B). HPI expression is reduced in the LF82 *csgD* (Figure 5A and 5C), *adrA*, *bcsB*, *qseB* and *glgCAP* mutants (Figure 5D) suggesting that the presence of the biofilm matrix is important for HPI expression.

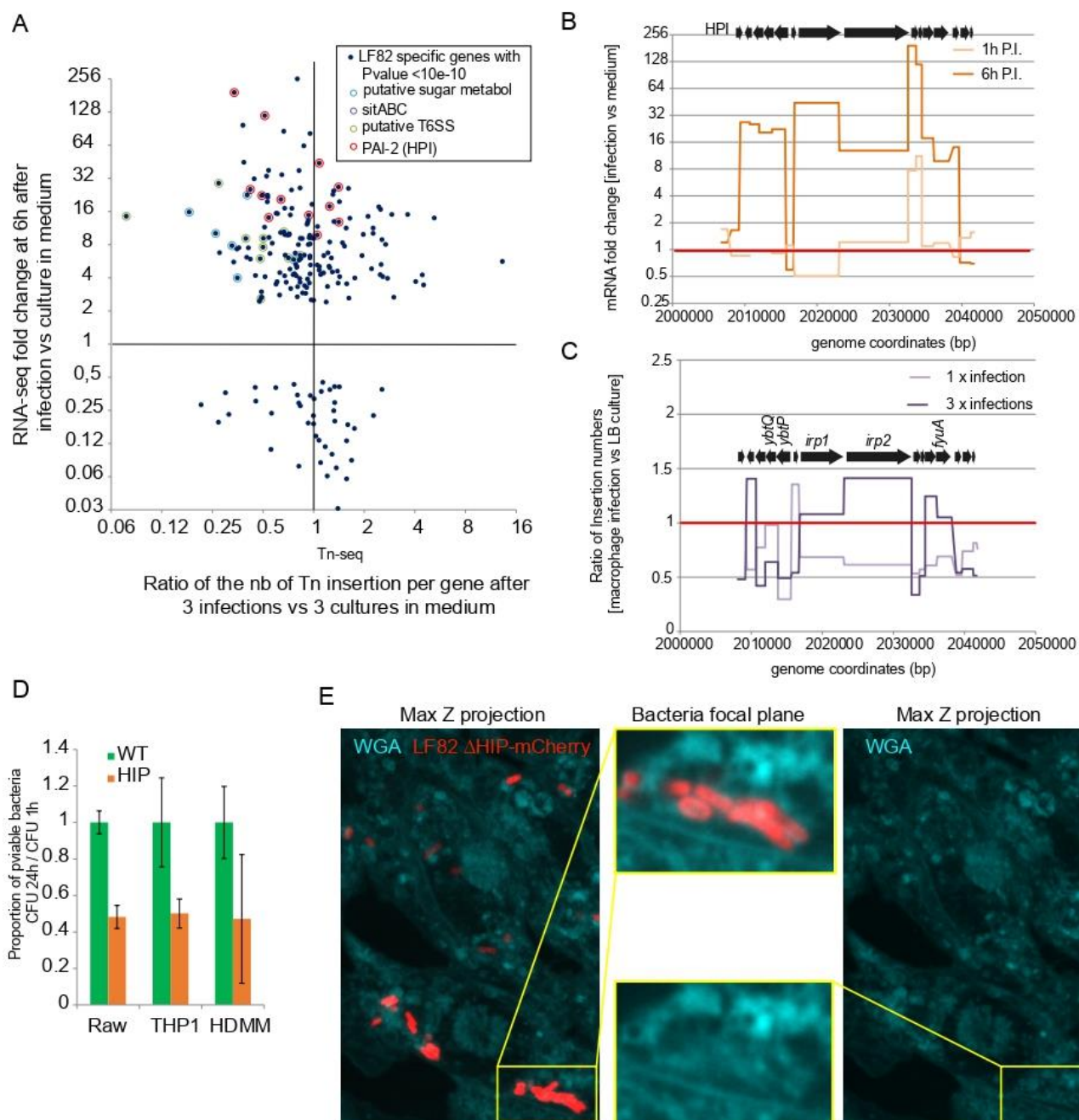


Figure 4: The High Pathogenicity Island (HPI) contribute to IBC formation. A) Scatter plot representing RNA-seq and Tn-seq data for LF82 specific genes (not present in the genome of *E. coli* K12). Only genes with a DE-seq P value $<10^{-10}$ are represented. Genes highlighted with a cyan circle are members of putative sugar metabolism cluster localized at (1566633 – 1572808 bp), red circles highlight genes from the pathogenicity island PAI-II or High Pathogenicity Island (2009366 - 2039595 bp), purple circles highlight the *sitABCD* cluster (1218516 – 1228935 bp) green circles highlight genes from a putative T6SS (1404073- 1517973 bp). B) Stair plot of the mRNA fold change of the HPI locus. C) Stair plot of the Tn-seq data for the HPI locus. D) Proportion of viable bacteria at 24 h P.I. of Raw, THP1 and HDMM macrophages in comparison to 1 h. LF82 (green) and LF82 *hpi* deletion mutants (orange). E) Imaging of LF82 Δ HPI mutant 24h P.I. of Raw macrophages. Exopolysaccharides were stained with lectin WGA.

HPI and iron homeostasis

Bacteria face iron limiting conditions in mammalian host, where free iron is normally bound to sequestering proteins such as transferrin. By lowering the iron levels, the organism tries to arrest the proliferation of iron-dependent pathogens. Bacterial pathogens have developed various strategies to capture intracellular iron. The HPI found in many pathogenic enterobacteriaceae encodes a highly efficient iron capture system based on the yersiniabactin siderophore. RNA-seq experiments showed that inside macrophages most iron capture systems were repressed except the one encoded by HPI which is highly overexpressed (Figure 5E). This observation suggests that the Yersiniabactin system is particularly adequate to capture iron in the specific context of AIEC LF82's IBC formed within phagolysosomes.

LF82 induce an iron response of the macrophage

LF82 infection significantly impact THP1 macrophage transcriptome (Figure 5F, Table S6). As expect we observed the induction of the antimicrobial humoral immune response (CXCL1, CXCL2, CXCL3, IL1 and IL8 genes were among the most significantly changed genes), the induction of inflammatory response (TNF, CCR7, NFKBIA, OSM, CCL3L3, NFBIZ, PTSG2), the induction of TNF and the response to its production (CCL1, CCL3, CCL3 and CCL20 genes) and the lymphocyte activation pathway (CD80, IL23A). Beside this response to infection we explored Human RNA-seq data to observe for eventual signs of an iron homeostasis dysregulation (Figure 5G). Transcript levels of several genes involved in iron homeostasis were significantly changed at 6h P.I.. IL6, Ferritin, Iron Chaperones PCBP 1-3 and the ferrous iron transporter DMT1 were significantly overexpressed while Ferroportin, HCP1, HMOX1 and HMOX2 expression decreased. Surprisingly the expression of the HAMP and LCN2 genes, respectively coding for Hepcidin and Lipocalin, two of the main players of the observed hypoferremia in response to infection by other pathogens were not changed (Table S7). Our observations suggest that the formation of LF82 IBC is correlated with a modification of iron homeostasis in the macrophage that might provoke iron expulsion from phagolysosomes and its retention Ferritin within the cytoplasm or the mitochondria of macrophages.

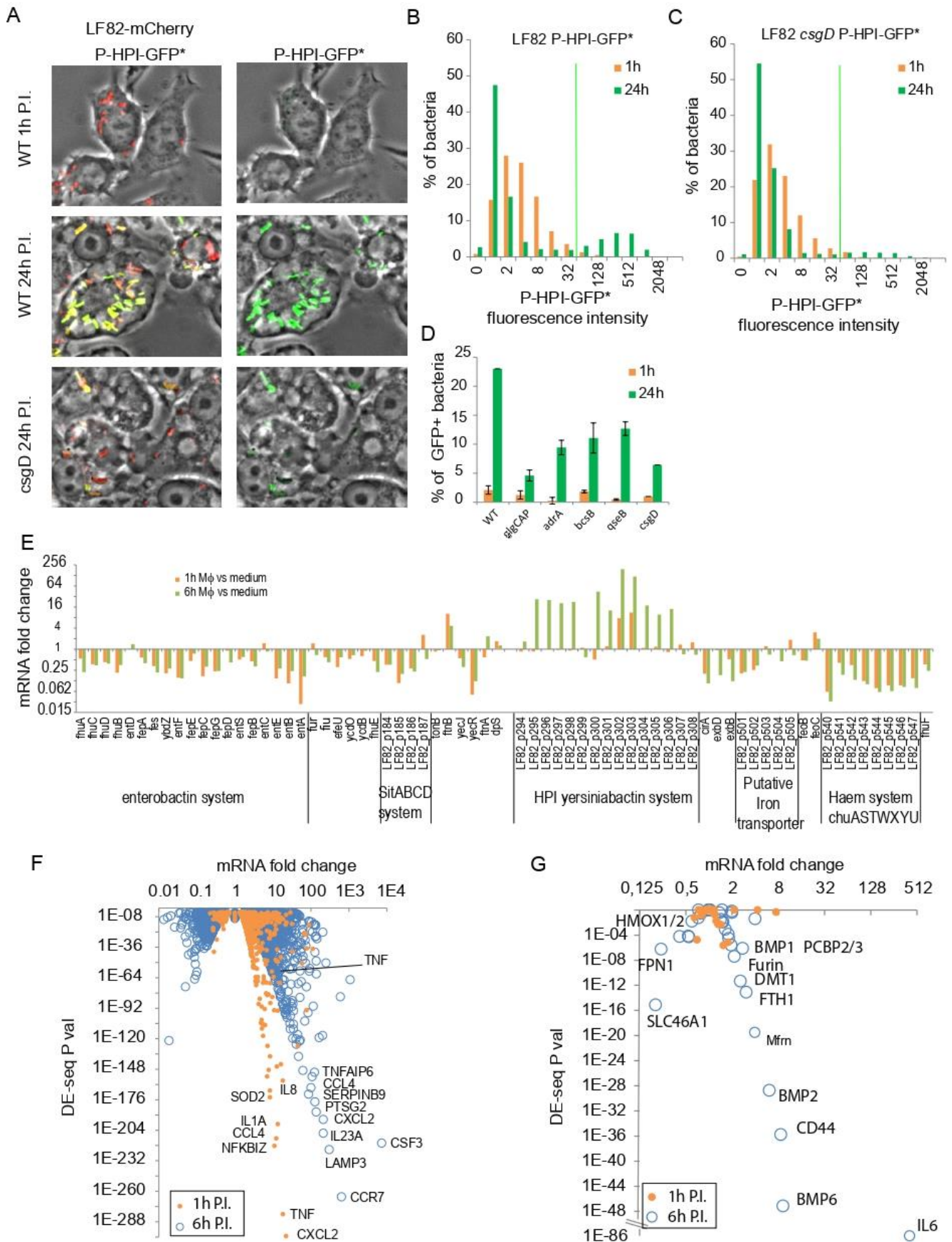


Figure 5: The formation of exopolysaccharide matrix and the iron homeostasis are interconnected.

A) Imaging of the expression of the HPI promoter monitored with an unstable GFP fusion. WT and

csgD mutant LF82 –mCherry strains expressing the P-HPI-GFP* from a plasmid were imaged. B) Quantification of the distribution of P-HPI-GFP* fluorescence in LF82. F) Quantification of the distribution of P-HPI-GFP* fluorescence in LF82 *csgD* mutant. C) Quantification of the % of P-HPI-GFP* positive in WT and *glgCAP*, *adrA*, *bcsB*, *qseB* and *csgD* LF82 mutants. E) Expression data from RNA-seq experiments at 1h and 6h P.I. of THP1 macrophages for the genes annotated for their participation in iron homeostasis in LF82. Genes were organized according to their position on the genome. Clusters of genes are delineated by a vertical line. F) Expression data of the Human genes from RNA-seq experiments at 1h and 6h P.I. of THP1 macrophages. Selected genes with highly significant expression changes are noted. G) Expression data from RNA-seq experiments at 1h and 6h P.I. of THP1 macrophages for the genes annotated for their participation in iron homeostasis in Human. Selected genes with significant expression changes are noted.

Discussion:

Within phagolysosomes LF82 present the characteristics of an IBC

Although there is a strong line of evidence supporting the role of AIEC in promoting gut inflammation and exacerbating CD pathology, the genetic determinants that discriminate AIEC from commensals have remained elusive. In the present work we demonstrated that LF82 forms IBC with biofilm-like traits inside phagolysosomes a characteristic that is not observed with a control laboratory strain. Immediately upon infection, stringent response induction slows down LF82 growth rate for a 6 to 10 h period. Late during this step we observed the induction of many genes involved in the biofilm pathway (Figure 1). LF82 growth resumes at 10h concomitantly with the appearing of an extracellular matrix formed of exopolysaccharides and curli fibers around bacteria (Figure2). Deletions, interruptions by a transposon of genes involved in the biofilm pathway (Figure 2) or chemical inhibition by cis-2 decenoic acid (Figure 3) stopped the formation of the exopolysaccharide matrix and were detrimental for LF82 survival within murine and human macrophages (Figure 3). In addition, IBC appears to stimulate the formation of antibiotic tolerant LF82. Altogether these results suggest that the IBC is an integral part of the adaptation that LF82 has to perform to survive within phagolysosomes. IBC with biofilm-like traits have also been observed for uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) during invasion of urothelial cells lining in the urinary bladder (Anderson *et al*, 2003). In this biofilm state, UPEC evades host defense and persist despite antibiotic therapy. Interestingly, AIEC are genetically closely related to uropathogenic *E. coli* (Nash *et al*, 2010). After invasion, UPEC replicate rapidly (doubling times of 30-35 minutes) for up to 8 hours and form a loose collection of hundreds of bacteria (Scott *et al*, 2015). At this point growth rate slows down and UPEC develops pods with biofilm-like traits. The kinetics of IBC formation differs with LF82, they remain in a non-replicative state for several hours P.I. and the biofilm traits appear concomitantly with return to growth of a part of the population. We also observed an exopolysaccharide matrix inside phagolysosomes containing few (1 to 5) LF82 bacteria (Figure 2). This suggests that bacterial multiplication should happen and inside the biofilm and develops the IBC.

What are the selective advantages produced by the IBC ?

Biofilms formed on abiotic surfaces or on epithelium are known to provide resistance to mechanical stress imposed by flow. At first glance, this might not be an important characteristic for IBC that are confined within phagolysosome membrane. However this characteristic might be at play on the long term if macrophages die and release the IBC, this structure might protect LF82 from dispersal by flow or from antibiotics present in the digestive tract and eventually from phagocytosis by another macrophage. Once phagocytosed by a secondary macrophage IBC might provide an immediate important bacterial load, harder to eliminate by macrophage than single bacteria. In Crohn's disease patients such phenomenon might explain chronic resurgence of AIEC (Alhagamhmad *et al*, 2016). Alternatively it is possible that biofilm forms a physical barrier to toxic compounds produced by the macrophages, perhaps by limiting their diffusion to the core of IBCs (Mah & O'Toole, 2001). It has been observed that resistance to antimicrobial peptides is mainly based on the interaction between peptides and biofilm exopolymers. These polymers may work by electrostatic repulsion and/or sequestration of antibacterial substances (Otto, 2006). Finally we can also postulate that IBC provide a nutrient niche for LF82. The strong stringent response induction and the metabolic switches that we detected in the RNA-seq data suggest that phagolysosomes impose a severe depletion in nutrients to LF82. Cannibalism of dead LF82 might be at play in the phagolysosome and the matrix may facilitate it (López *et al*, 2009). During co-infection experiments we observed K12-C600 *E. coli* within LF82 IBCs (Figure 2). We can postulate that in the context of the Human gut such multispecies IBC are formed and that LF82 can feed on commensal bacteria. The presence of three putative type 6 secretion systems in the genome of LF82 suggests that it is well armed to kill foreign IBC residents.

HPI is required to for IBC within phagolysosomes.

Using molecular genomics methods we surveyed the genome of LF82 to identify determinants that allow this bacterium to form structured IBC while commensal *E. coli* do not. LF82 presents 925 genes that are absent from the genome of K12 MG1655. Among them only a few seems to be specific to AIEC (Nash *et al*, 2010), it is therefore likely that their phenotypical characteristics emerged from a combination of genes or from patho adaptative mutations (Miquel *et al*, 2010b). Here we present evidences suggesting that LF82 requires the combined action of the biofilm pathway present on *E. coli* core genome and a

particular iron capture system encoded by a pathogenicity island (HPI) acquired by horizontal transfer to establish the IBC. An analysis of the genetic diversity of *E. coli* isolated from patient with Crohn disease revealed that 25 out of 32 strains (78%) encode the *irp2* gene and presumably the rest of the HPI cluster in their genome. Among these 32 strains only 13 presented an AIEC phenotype the prevalence of *irp2* in this group was 70% (Céspedes *et al*, 2017). By contrast this association was only 30% for the control group. In addition this analysis revealed that the presence of *chuA*, *fhuD* or *irp2*, three genes involved in iron capture systems, in the genome is a strong marker for *E. coli* associated with Crohn's disease. Enterobacteriaceae (*Yersinia* species or ExPEC *E. coli*) that contain the HPI display increased virulence. The role of the HPI is to synthesize, export and capture Yersiniabactin bound to Fe³⁺. Therefore Yersiniabactin facilitates iron uptake, which is essential for bacterial growth. In an environment with very limited free iron, such as the human body, where most iron is bound to proteins, bacterial expression of the HPI genes has been shown to be elevated (Chauvaux *et al*, 2007). We observed that 6h P.I. HPI is the only iron capture system with an increased expression compared to the growth medium. This suggests that Yersiniabactin is particularly well suited for iron capture within macrophage. It has been observed that Yersiniabactin increases *E. hormaechei* growth when iron-saturated Lactoferrin is the main iron source (Paauw *et al*, 2009). Inside THP1 macrophages Transferrin and Lactoferrin genes are expressed at a similar level but Lactoferrin is 2.5 overexpressed in the presence of LF82. Additional experiments will be required to test if Yersiniabactin and Lactoferrin are indeed present in the LF82 phagolysosomes and may compete for iron. An alternative possibility could be that the chemical nature of the phagolysosome limits the iron capture propensity of the enterobactin siderophore and other iron transport system increasing the selective pressure for Yersiniabactin. Finally, Yersiniabactin might also contribute to the protection of LF82 from iron (Paauw *et al*, 2009) or copper toxicity (Koh *et al*, 2017) that may be particularly relevant to phagolysosomal compartments and other restricted spaces in which reactive oxygen species are abundant (White *et al*, 2009).

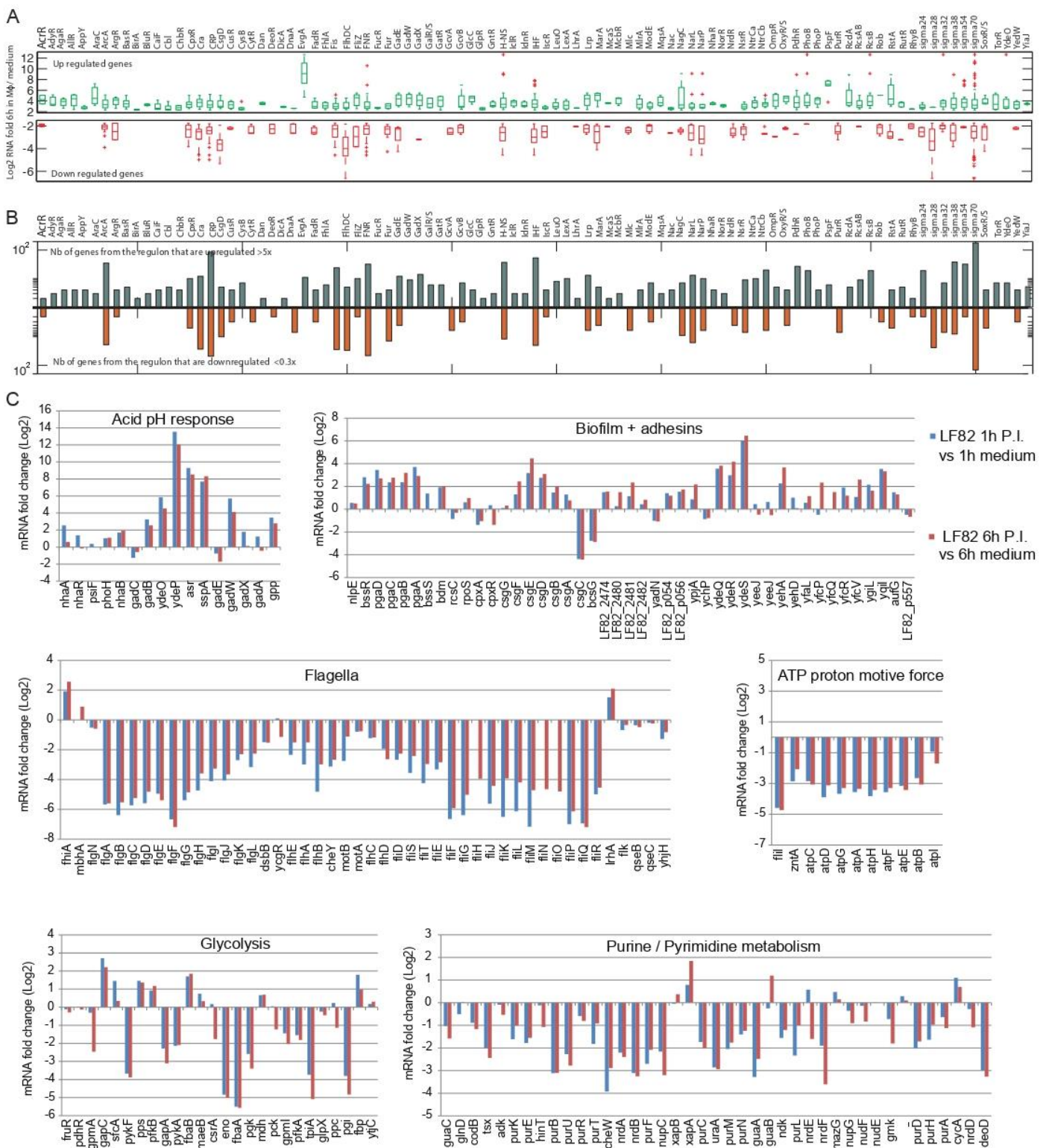
Iron capture and biofilm formation

Our results show a direct link between iron capture and biofilm formation. We simultaneously observed that HPI expression is controlled by the biofilm pathway and the formation of the exopolysaccharide matrix is altered when the HPI is deleted. This suggests a

synergistic effect between these elements. Links between biofilm and iron homeostasis supporting this synergy have already been documented in a couple of cases. First, it has been observed that the availability of iron greatly influences UPEC ability to form biofilm on abiotic surface in urine medium (a poor source of iron), interestingly this phenomenon was also dependent on the Yersiniabactin system (Hancock *et al*, 2008). Second, *Pseudomonas aeruginosa* uses exopolysaccharides to sequester and store iron and stimulate biofilm formation (Yu *et al*, 2016 Kang & Kirienko, 2018)). Negatively charged exopolysaccharides would chelate Fe^{3+} and Fe^{2+} in the vicinity of the bacteria and allow its capture. This scenario could be particularly interesting in the closed environment of the phagolysosomes where iron might be expelled by the DMT1 Fe^{2+} transporter.

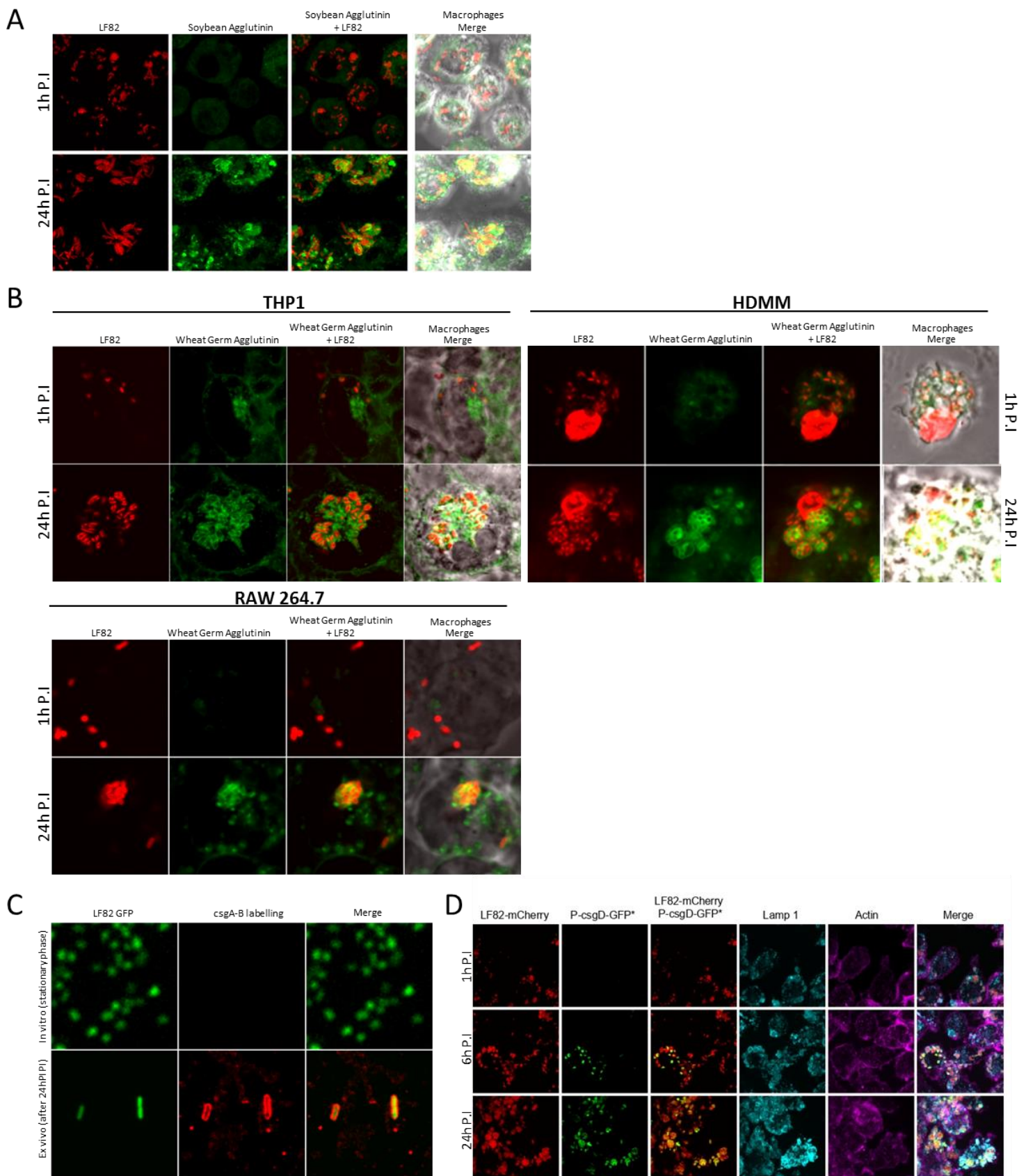
A complex adaptive strategy to colonize a stressful niche

Altogether our results suggest that to adapt to the harsh environment of the phagolysosomes AIEC bacteria used a complex strategy involving a huge transcriptomic response, a phenotypic switch, at mechanisms to capture essential nutrients and a molecular shield to protect the IBC from environmental stresses. The nutrient scarcity of the phagolysosomes, because it induces stringent response and HPI expression, appeared to be an essential determinant of this strategy. Future work will be required to determine if the phenotypic switch (growing – non growing), the production of extracellular matrix and iron capture are connected pathways. Links between stringent response and biofilm formation have already been documented in salmonella (Azriel *et al*, 2015). Common regulator such as DksA, CsgD or c-di-GMP for these three pathways might explain the kinetics of macrophage infection by LF82. Our observations suggest that other pathobiont bacteria equipped with a biofilm production apparatus and adequate iron capture system might also survive and form IBC within macrophage. Does the colonization of this difficult niche represent a selective advantage for AIEC or other bacteria in the context of Crohn's disease or other disease involving dysbiosis? Investigating this aspect should provide future leads for antibacterial based precision medicine strategies.

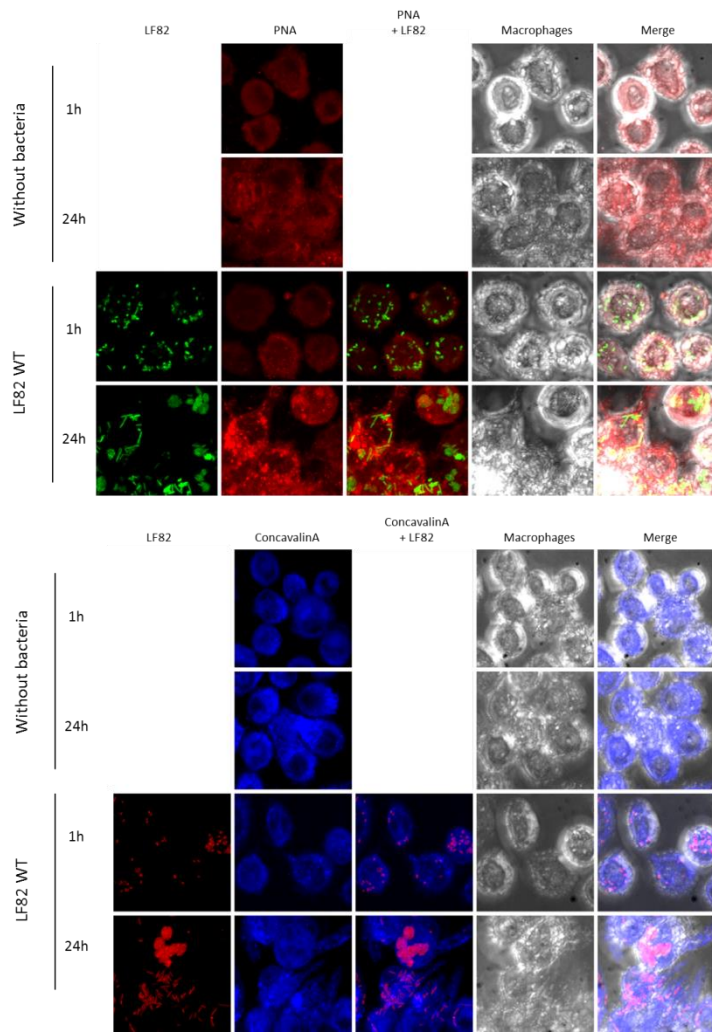


Supplementary Figure S1: A) RNA-seq data from LF82 infecting THP1 Macrophages for 6h P.I. compared to liquid medium culture were analyzed according to regulon information. Regulon annotations were extracted from Regulon DB. For each transcription factors the RNA-seq data from its regulated genes were collected, only genes with a significant fold change (DEseq - P value < 10^{-10}) were considered. Box plot represent the median fold change of up regulated and down regulated genes from each regulon (bar), the distribution of 75% of the population (box) and outliers (cross). **B)** RNA-seq data from LF82 infecting THP1 Macrophages for 6h P.I. compared to liquid medium culture were analyzed according to regulon information. The numbers of upregulated and down regulated

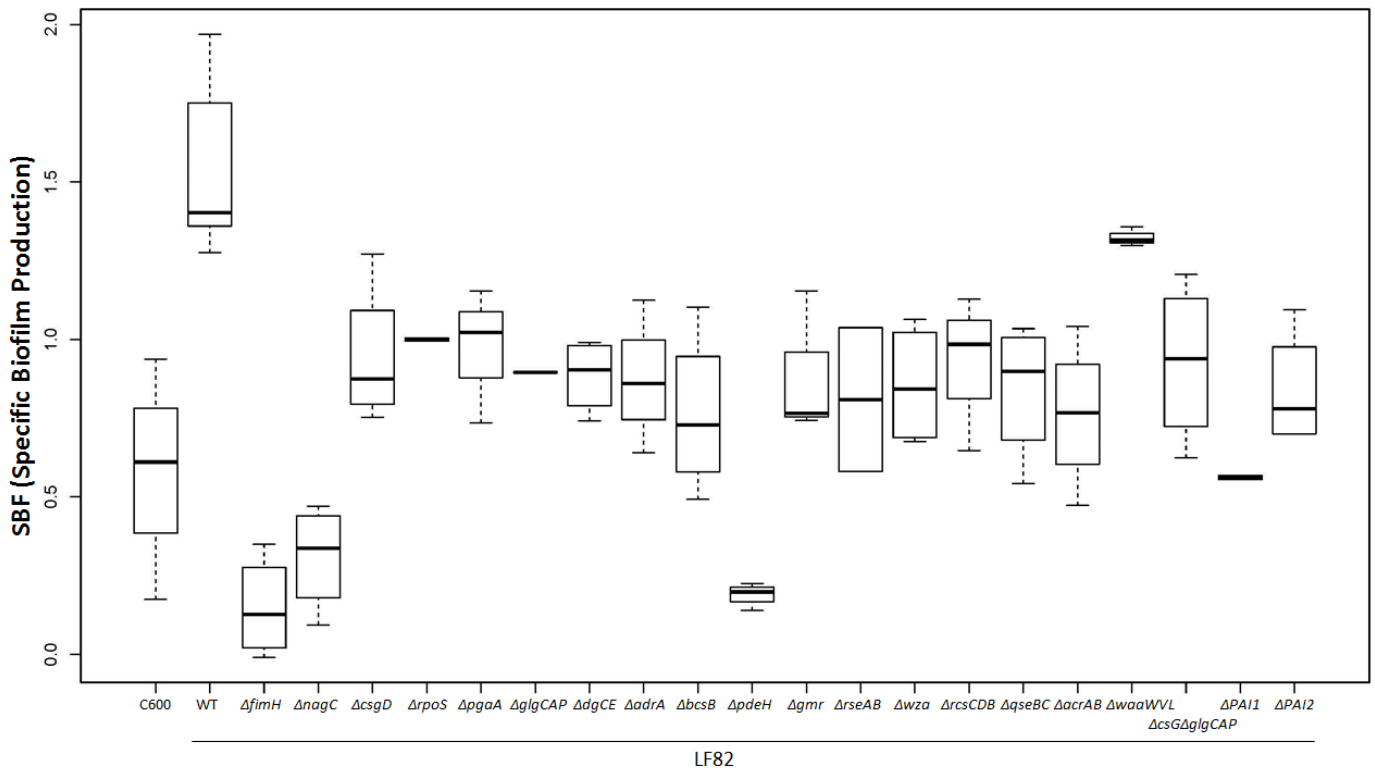
genes from each regulon are plotted. **C)** Histogram showing the fold change of expression of each LF82 genes belonging to the acid pH response, biofilm and adhesins, flagella, glycolysis, ATP proton motive force and purine-pyrimidine metabolism annotation groups. For each gene unfiltered 1h P.I and 6h P.I. RNA-seq data are plotted.



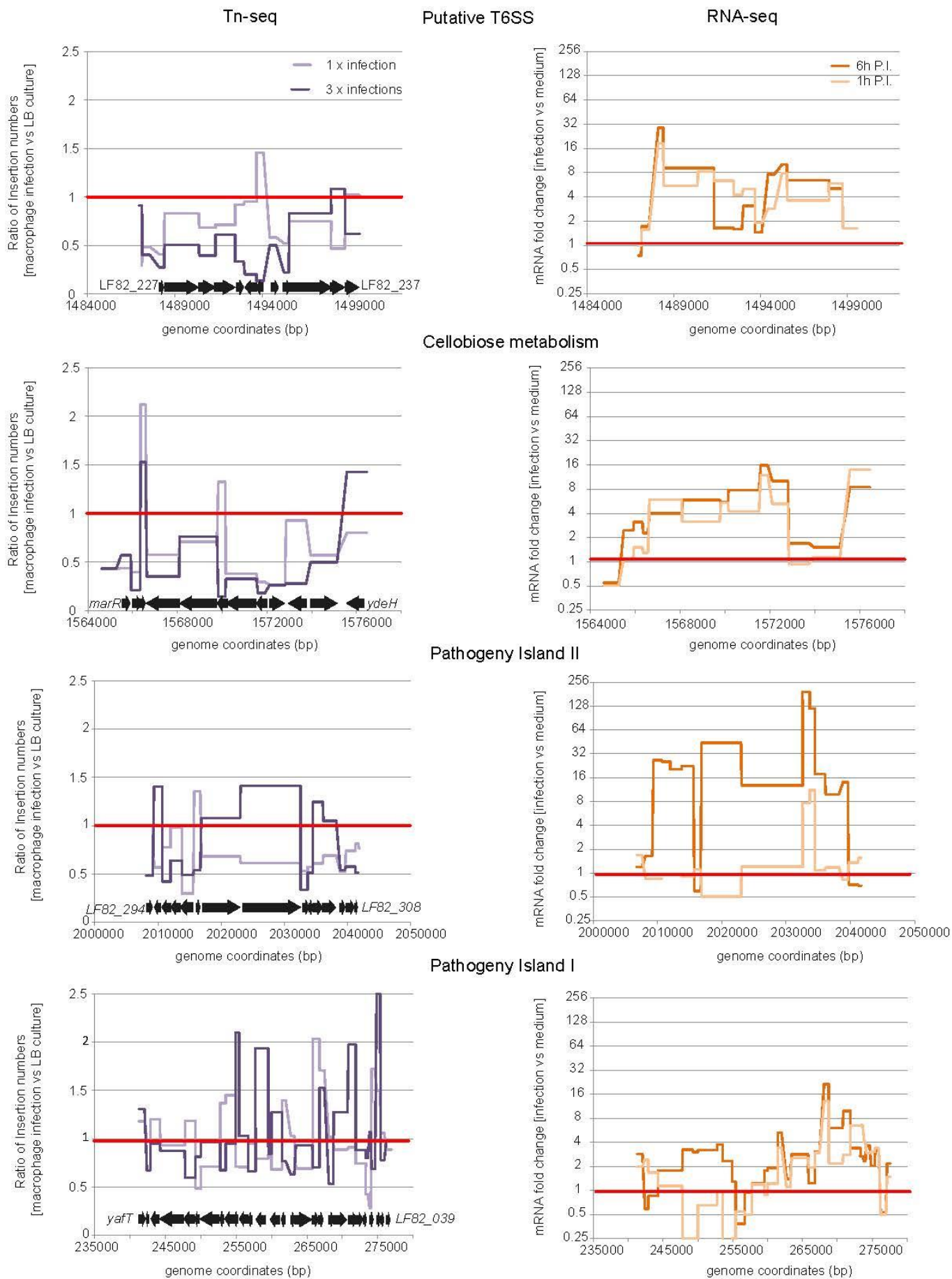
Supplementary figure S2: LF82 start to assemble exopolysaccharide matrix at 6h P.I. A) SBA labeling of LF82 IBC 24h P.I. of raw macrophages. B) WGA labeling of LF82 IBC at 1h and 24h P.I. of THP1, HDMM and Raw 264.7 macrophages. C) Imaging of curli fibers (antibody for CsgA and B, red) formed around LF82 after 24h PI in macrophages and nothing in vitro (stationary phase). D) Monitoring of the expression of the *csgD* promoter with a fusion with an unstable GFP (P-csgD-GFP*).



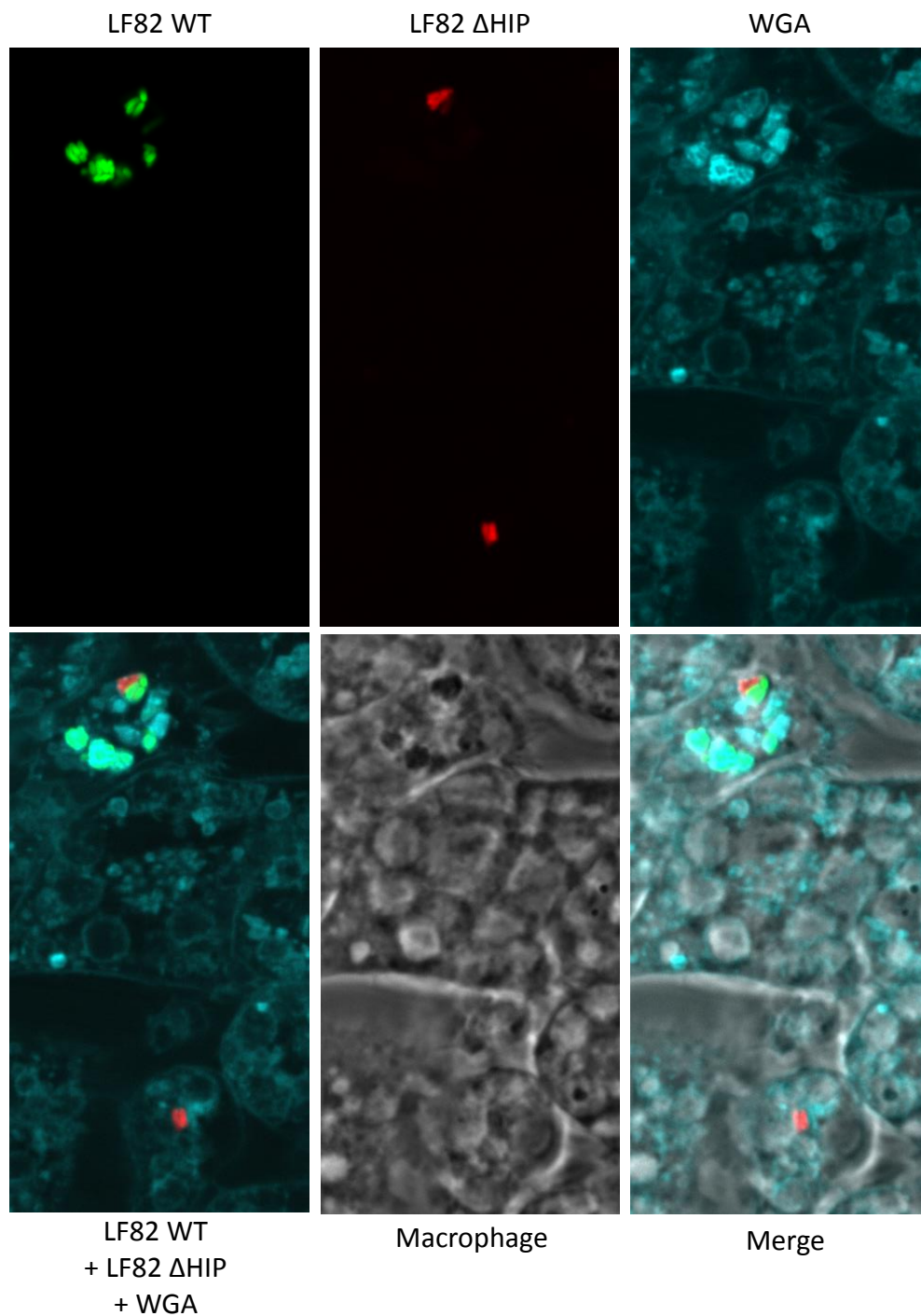
Supplementary figure S3: LF82 IBC did not present concavalin or PNA staining



Supplementary figure S4 : Quantifying the formation of biofilm in vitro, SBF (specific biofilm formation)



Supplementary figure S5: A) Stair plot of the Tn-seq and RNA-seq data for the putative T6SS, cellulobiose metabolism, pathogeny island II, pathogeny island I.



Supplementary figure S6: 24h P.I. of Raw 264.7 macrophages, extracellular polysaccharide structures (Cyan) revealed by wheat Germ Agglutinin (WGA) are observed inside phagolysosomes containing LF82-GFP but not inside phagolysosomes containing only LF82 Δ HIP-mCherry bacteria.

Bibliography

- AbdelRahman, Yasser M., et Robert J. Belland. 2005. « The chlamydial developmental cycle ». *FEMS Microbiology Reviews* 29 (5): 949- 59. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.03.002>.
- Abdullah, Zeinab, Sergej Geiger, Andrea Nino-Castro, Jan P. Böttcher, Eugenia Muraliv, Moritz Gaidt, Frank A. Schildberg, et al. 2012. « Lack of PPAR γ in Myeloid Cells Confers Resistance to *Listeria Monocytogenes* Infection ». *PLoS One* 7 (5): e37349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037349>.
- Abergel, Rebecca J., Jeffrey A. Warner, David K. Shuh, et Kenneth N. Raymond. 2006. « Enterobactin Protonation and Iron Release: Structural Characterization of the Salicylate Coordination Shift in Ferric Enterobactin ». *Journal of the American Chemical Society* 128 (27): 8920- 31. <https://doi.org/10.1021/ja062046j>.
- Adams, J. L., et R. J. McLean. 1999. « Impact of RpoS Deletion on *Escherichia Coli* Biofilms ». *Applied and Environmental Microbiology* 65 (9): 4285- 87.
- Adams, Kristin N., Kevin Takaki, Lynn E. Connolly, Heather Wiedenhoft, Kathryn Winglee, Olivier Humbert, Paul H. Edelstein, Christine L. Cosma, et Lalita Ramakrishnan. 2011. « Drug Tolerance in Replicating Mycobacteria Mediated by a Macrophage-Induced Efflux Mechanism ». *Cell* 145 (1): 39- 53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.022>.
- Agbor, Terence A., et Beth A. McCormick. 2011. « Salmonella Effectors: Important Players Modulating Host Cell Function during Infection ». *Cellular Microbiology* 13 (12): 1858- 69. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01701.x>.
- Alegria, Marcos C., Diorge P. Souza, Maxuel O. Andrade, Cassia Docena, Leticia Khater, Carlos H. I. Ramos, Ana C. R. da Silva, et Chuck S. Farah. 2005. « Identification of New Protein-Protein Interactions Involving the Products of the Chromosome- and Plasmid-Encoded Type IV Secretion Loci of the Phytopathogen *Xanthomonas Axonopodis* Pv. Citri ». *Journal of Bacteriology* 187 (7): 2315- 25. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2315-2325.2005>.
- Alhagahmad, Moftah H., Andrew S. Day, Daniel A. Lemberg, et Steven T. Leach. 2016a. « An Overview of the Bacterial Contribution to Crohn Disease Pathogenesis ». *Journal of Medical Microbiology* 65 (10): 1049- 59. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000331>.
- . 2016b. « An Overview of the Bacterial Contribution to Crohn Disease Pathogenesis ». *Journal of Medical Microbiology* 65 (10): 1049- 59. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000331>.
- Alhede, Maria, Thomas Bjarnsholt, Michael Givskov, et Morten Alhede. 2014. « Chapter One - *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Mechanisms of Immune Evasion ». In *Advances in Applied Microbiology*, édité par Sima Sariaslani et Geoffrey M. Gadd, 86:1- 40. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00001-9>.
- Allegrucci, Magee, F. Z. Hu, K. Shen, J. Hayes, Garth D. Ehrlich, J. Christopher Post, et Karin Sauer. 2006. « Phenotypic Characterization of *Streptococcus pneumoniae* Biofilm Development ». *Journal of Bacteriology* 188 (7): 2325- 35. <https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2325-2335.2006>.
- Allegrucci, Magee, et Karin Sauer. 2007. « Characterization of Colony Morphology Variants Isolated from *Streptococcus Pneumoniae* Biofilms ». *Journal of Bacteriology* 189 (5): 2030- 38. <https://doi.org/10.1128/JB.01369-06>.
- Amato, Stephanie M., et Mark P. Brynildsen. 2015. « Persister Heterogeneity Arising from a Single Metabolic Stress ». *Current Biology: CB* 25 (16): 2090- 98. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.034>.
- Amorena, B., E. Gracia, M. Monzón, J. Leiva, C. Oteiza, M. Pérez, J. L. Alabart, et J. Hernández-Yago. 1999. « Antibiotic Susceptibility Assay for *Staphylococcus Aureus* in Biofilms Developed in Vitro ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44 (1): 43- 55. <https://doi.org/10.1093/jac/44.1.43>.
- Andersen, Kell K., Brian S. Vad, Carsten Scavenius, Jan J. Enghild, et Daniel E. Otzen. 2017. « Human Lysozyme Peptidase Resistance Is Perturbed by the Anionic Glycolipid Biosurfactant Rhamnolipid Produced by the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* ». *Biochemistry* 56 (1): 260- 70. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01009>.
- Anderson, Gregory G., Joseph J. Palermo, Joel D. Schilling, Robyn Roth, John Heuser, et Scott J. Hultgren. 2003a. « Intracellular Bacterial Biofilm-Like Pods in Urinary Tract Infections ». *Science* 301 (5629): 105- 7. <https://doi.org/10.1126/science.1084550>.
- . 2003b. « Intracellular Bacterial Biofilm-like Pods in Urinary Tract Infections ». *Science (New York, N.Y.)* 301 (5629): 105- 7. <https://doi.org/10.1126/science.1084550>.
- Appelberg, Rui. 2006. « Macrophage nutritive antimicrobial mechanisms ». *Journal of Leukocyte Biology* 79 (6): 1117- 28. <https://doi.org/10.1189/jlb.0206079>.

- Arnoldini, Markus, Rafal Mostowy, Sebastian Bonhoeffer, et Martin Ackermann. 2012. « Evolution of Stress Response in the Face of Unreliable Environmental Signals ». *PLoS Computational Biology* 8 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002627>.
- Arnoldini, Markus, Ima Avalos Vizcarra, Rafael Peña-Miller, Nicolas Stocker, Médéric Diard, Viola Vogel, Robert E. Beardmore, Wolf-Dietrich Hardt, et Martin Ackermann. 2014. « Bistable Expression of Virulence Genes in Salmonella Leads to the Formation of an Antibiotic-Tolerant Subpopulation ». *PLOS Biology* 12 (8): e1001928. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001928>.
- Azriel, Shalhevet, Alina Goren, Galia Rahav, et Ohad Gal-Mor. 2015. « The Stringent Response Regulator DksA Is Required for Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Growth in Minimal Medium, Motility, Biofilm Formation, and Intestinal Colonization ». *Infection and Immunity* 84 (1): 375- 84. <https://doi.org/10.1128/IAI.01135-15>.
- Bach, Sandrine, Alzira de Almeida, et Elisabeth Carniel. 2000. « The Yersinia high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae ». *FEMS Microbiology Letters* 183 (2): 289- 94. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08973.x>.
- Bakkeren, Erik, Jana S. Huisman, Stefan A. Fattinger, Annika Hausmann, Markus Furter, Adrian Egli, Emma Slack, et al. 2019. « Salmonella Persisters Promote the Spread of Antibiotic Resistance Plasmids in the Gut ». *Nature* 573 (7773): 276- 80. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1521-8>.
- Balaban, Nathalie Q., Jack Merrin, Remy Chait, Lukasz Kowalik, et Stanislas Leibler. 2004. « Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch ». *Science (New York, N.Y.)* 305 (5690): 1622- 25. <https://doi.org/10.1126/science.1099390>.
- Banin, Ehud, Michael L. Vasil, et E. Peter Greenberg. 2005. « Iron and Pseudomonas Aeruginosa Biofilm Formation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (31): 11076- 81. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504266102>.
- Barker, Jeffrey R., et Karl E. Klose. 2007. « Molecular and Genetic Basis of Pathogenesis in Francisella Tularensis ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1105 (juin): 138- 59. <https://doi.org/10.1196/annals.1409.010>.
- Barnich, Nicolas, Jérôme Boudeau, Laurent Claret, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2003. « Regulatory and Functional Co-Operation of Flagella and Type 1 Pili in Adhesive and Invasive Abilities of AIEC Strain LF82 Isolated from a Patient with Crohn's Disease ». *Molecular Microbiology* 48 (3): 781- 94. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03468.x>.
- Barnich, Nicolas, Frédéric A. Carvalho, Anne-Lise Glasser, Claude Darcha, Peter Jantschkeff, Matthieu Allez, Harald Peeters, et al. 2007. « CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease ». *Journal of Clinical Investigation* 117 (6): 1566- 74. <https://doi.org/10.1172/JCI30504>.
- Batchelor, Roger A., Bruce M. Pearson, Lorna M. Friis, Patricia Guerry, et Jerry M. Wells. 2004. « Nucleotide Sequences and Comparison of Two Large Conjugative Plasmids from Different Campylobacter Species ». *Microbiology (Reading, England)* 150 (Pt 10): 3507- 17. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27112-0>.
- Battesti, Aurelia, Nadim Majdalani, et Susan Gottesman. 2011. « The RpoS-Mediated General Stress Response in Escherichia Coli ». *Annual Review of Microbiology* 65: 189- 213. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102946>.
- Baumgart, Daniel C, et William J Sandborn. 2012. « Crohn's Disease ». *The Lancet* 380 (9853): 1590- 1605. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60026-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60026-9).
- Bäumler, A. J., J. G. Kusters, I. Stojiljkovic, et F. Heffron. 1994. « Salmonella Typhimurium Loci Involved in Survival within Macrophages ». *Infection and Immunity* 62 (5): 1623- 30.
- Bay, Denice C., Carol A. Stremick, Carmine J. Slipski, et Raymond J. Turner. 2017. « Secondary multidrug efflux pump mutants alter Escherichia coli biofilm growth in the presence of cationic antimicrobial compounds ». *Research in Microbiology* 168 (3): 208- 21. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.11.003>.
- Beloin, Christophe, Agnès Roux, et Jean-Marc Ghigo. 2008. « Escherichia coli biofilms ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 322: 249- 89.
- Benihoud, K., S. Esselin, D. Descamps, B. Jullienne, B. Salone, P. Bobé, D. Bonardelle, et al. 2007. « Respective Roles of TNF- α and IL-6 in the Immune Response-Elicited by Adenovirus-Mediated Gene Transfer in Mice ». *Gene Therapy* 14 (6): 533- 44. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302885>.
- Bereswill, Stefan, Stefan Greiner, Arnoud H. M. van Vliet, Barbara Waidner, Frank Fassbinder, Emile Schiltz, Johannes G. Kusters, et Manfred Kist. 2000. « Regulation of Ferritin-Mediated Cytoplasmic Iron

- Storage by the Ferric Uptake Regulator Homolog (Fur) of *Helicobacter Pylori* ». *Journal of Bacteriology* 182 (21): 5948- 53. <https://doi.org/10.1128/JB.182.21.5948-5953.2000>.
- Bergsbaken, Tessa, Susan L. Fink, et Brad T. Cookson. 2009. « Pyroptosis: Host Cell Death and Inflammation ». *Nature Reviews. Microbiology* 7 (2): 99- 109. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>.
- Berin, M. Cecilia, Hongxing Li, et Kirk Sperber. 2006. « Antibody-Mediated Antigen Sampling across Intestinal Epithelial Barriers ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1072 (1): 253- 61. <https://doi.org/10.1196/annals.1326.002>.
- Bernier, Steve P., David Lebeaux, Alicia S. DeFrancesco, Amandine Valomon, Guillaume Soubigou, Jean-Yves Coppée, Jean-Marc Ghigo, et Christophe Beloin. 2013. « Starvation, Together with the SOS Response, Mediates High Biofilm-Specific Tolerance to the Fluoroquinolone Ofloxacin ». *PLoS Genetics* 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003144>.
- Beveridge, Terry J. 1999. « Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles ». *Journal of Bacteriology* 181 (16): 4725- 33.
- Bielen, Kenny, Bart 'S Jongers, Jan Boddaert, Tom K. Raju, Christine Lammens, Surbhi Malhotra-Kumar, Philippe G. Jorens, Herman Goossens, et Samir Kumar-Singh. 2017. « Biofilm-Induced Type 2 Innate Immunity in a Cystic Fibrosis Model of *Pseudomonas aeruginosa* ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (juin). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00274>.
- Bokranz, Werner, Xiaoda Wang, Helmut Tschäpe, et Ute Römling. 2005. « Expression of Cellulose and Curli Fimbriae by *Escherichia Coli* Isolated from the Gastrointestinal Tract ». *Journal of Medical Microbiology* 54 (Pt 12): 1171- 82. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46064-0>.
- BoseDasgupta, Somdeb, et Jean Pieters. 2018. « Macrophage-Microbe Interaction: Lessons Learned from the Pathogen *Mycobacterium Tuberculosis* ». *Seminars in Immunopathology* 40 (6): 577- 91. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0710-0>.
- Boudeau, Jérôme, Nicolas Barnich, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2001. « Type 1 Pili-Mediated Adherence of *Escherichia Coli* Strain LF82 Isolated from Crohn's Disease Is Involved in Bacterial Invasion of Intestinal Epithelial Cells ». *Molecular Microbiology* 39 (5): 1272- 84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2001.02315.x>.
- Boudeau, Jerome, Anne-Lise Glasser, Estelle Masseret, Bernard Joly, et Arlette Darfeuille-Michaud. 1999. « Invasive Ability of an *Escherichia Coli* Strain Isolated from the Ileal Mucosa of a Patient with Crohn's Disease ». *Infection and Immunity* 67 (9): 4499- 4509.
- Boyer, Frédéric, Gwennaële Fichant, Jérémie Berthod, Yves Vandenbrouck, et Ina Attree. 2009. « Dissecting the Bacterial Type VI Secretion System by a Genome Wide in Silico Analysis: What Can Be Learned from Available Microbial Genomic Resources? » *BMC Genomics* 10 (mars): 104. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-104>.
- Branca, Jacopo J. V., Massimo Gulisano, et Claudio Nicoletti. 2019. « Intestinal epithelial barrier functions in ageing ». *Ageing Research Reviews* 54 (septembre): 100938. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100938>.
- Brauner, A., S. H. Jacobson, et I. Kühn. 1992. « Urinary *Escherichia Coli* Causing Recurrent Infections--a Prospective Follow-up of Biochemical Phenotypes ». *Clinical Nephrology* 38 (6): 318- 23.
- Bretin, Alexis, Cécily Lucas, Anaïs Larabi, Guillaume Dalmasso, Elisabeth Billard, Nicolas Barnich, Richard Bonnet, et Hang Thi Thu Nguyen. 2018. « AIEC Infection Triggers Modification of Gut Microbiota Composition in Genetically Predisposed Mice, Contributing to Intestinal Inflammation ». *Scientific Reports* 8 (1): 1- 14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30055-y>.
- Bringer, Marie-Agnès, Nicolas Barnich, Anne-Lise Glasser, Olivier Bardot, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2005a. « HtrA Stress Protein Is Involved in Intramacrophagic Replication of Adherent and Invasive *Escherichia coli* Strain LF82 Isolated from a Patient with Crohn's Disease ». *Infection and Immunity* 73 (2): 712- 21. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.712-721.2005>.
- . 2005b. « HtrA Stress Protein Is Involved in Intramacrophagic Replication of Adherent and Invasive *Escherichia Coli* Strain LF82 Isolated from a Patient with Crohn's Disease ». *Infection and Immunity* 73 (2): 712- 21. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.712-721.2005>.
- Bringer, Marie-Agnès, Elisabeth Billard, Anne-Lise Glasser, Jean-Frédéric Colombel, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2012. « Replication of Crohn's Disease-Associated AIEC within Macrophages Is Dependent on TNF- α Secretion ». *Laboratory Investigation* 92 (3): 411- 19. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.156>.
- Bringer, Marie-Agnès, Anne-Lise Glasser, Ching-Hsuan Tung, Stéphane Méresse, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2006a. « The Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia Coli* Strain LF82 Replicates in

- Mature Phagolysosomes within J774 Macrophages ». *Cellular Microbiology* 8 (3): 471- 84. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00639.x>.
- . 2006b. « The Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages ». *Cellular Microbiology* 8 (3): 471- 84. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00639.x>.
- Bringer, Marie-Agnès, Nathalie Rolhion, Anne-Lise Glasser, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2007a. « The Oxidoreductase DsbA Plays a Key Role in the Ability of the Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia Coli Strain LF82 to Resist Macrophage Killing ». *Journal of Bacteriology* 189 (13): 4860- 71. <https://doi.org/10.1128/JB.00233-07>.
- . 2007b. « The Oxidoreductase DsbA Plays a Key Role in the Ability of the Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia Coli Strain LF82 To Resist Macrophage Killing ». *Journal of Bacteriology* 189 (13): 4860- 71. <https://doi.org/10.1128/JB.00233-07>.
- Brombacher, Eva, Andrea Baratto, Corinne Dorel, et Paolo Landini. 2006. « Gene Expression Regulation by the Curli Activator CsgD Protein: Modulation of Cellulose Biosynthesis and Control of Negative Determinants for Microbial Adhesion ». *Journal of Bacteriology* 188 (6): 2027- 37. <https://doi.org/10.1128/JB.188.6.2027-2037.2006>.
- Brooun, A., S. Liu, et K. Lewis. 2000. « A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in Pseudomonas Aeruginosa Biofilms ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (3): 640- 46. <https://doi.org/10.1128/aac.44.3.640-646.2000>.
- Brown, G. C., A. Vilalta, et M. Fricker. 2015. « Phagoptosis - Cell Death By Phagocytosis - Plays Central Roles in Physiology, Host Defense and Pathology ». *Current Molecular Medicine* 15 (9): 842- 51.
- Brown, Larissa, Daniel Gentry, Thomas Elliott, et Michael Cashel. 2002. « DksA Affects ppGpp Induction of RpoS at a Translational Level ». *Journal of Bacteriology* 184 (16): 4455- 65. <https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4455-4465.2002>.
- Bruin, Olle M. de, Jagjit S. Ludu, et Francis E. Nano. 2007. « The Francisella Pathogenicity Island Protein IgIA Localizes to the Bacterial Cytoplasm and Is Needed for Intracellular Growth ». *BMC Microbiology* 7 (janvier): 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-1>.
- Brumell, John H., Patrick Tang, Scott D. Mills, et B. Brett Finlay. 2001. « Characterization of Salmonella-Induced Filaments (Sifs) Reveals a Delayed Interaction Between Salmonella-Containing Vacuoles and Late Endocytic Compartments ». *Traffic* 2 (9): 643- 53. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.20907.x>.
- Buret, Andre Gerald, Jean-Paul Motta, Thibault Allain, Jose Ferraz, et John Lawrence Wallace. 2019. « Pathobiont release from dysbiotic gut microbiota biofilms in intestinal inflammatory diseases: a role for iron? » *Journal of Biomedical Science* 26 (janvier). <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0495-4>.
- Buttó, Ludovica F., Monika Schaubeck, et Dirk Haller. 2015. « Mechanisms of Microbe-Host Interaction in Crohn's Disease: Dysbiosis vs. Pathobiont Selection ». *Frontiers in Immunology* 6: 555. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00555>.
- Carpenter, Chandra, et Shelley M. Payne. 2014. « Regulation of iron transport systems in Enterobacteriaceae in response to oxygen and iron availability ». *Journal of inorganic biochemistry* 133 (avril): 110- 17. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.01.007>.
- Cascales, Eric. 2008. « The type VI secretion toolkit ». *EMBO reports* 9 (8): 735- 41. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.131>.
- Celli, Jean, Chantal de Chastellier, Don-Marc Franchini, Javier Pizarro-Cerda, Edgardo Moreno, et Jean-Pierre Gorvel. 2003. « Brucella Evades Macrophage Killing via VirB-Dependent Sustained Interactions with the Endoplasmic Reticulum ». *Journal of Experimental Medicine* 198 (4): 545- 56. <https://doi.org/10.1084/jem.20030088>.
- Cerca, Nuno, Kimberly K. Jefferson, Rosario Oliveira, Gerald B. Pier, et Joana Azeredo. 2006. « Comparative Antibody-Mediated Phagocytosis of Staphylococcus Epidermidis Cells Grown in a Biofilm or in the Planktonic State ». *Infection and Immunity* 74 (8): 4849- 55. <https://doi.org/10.1128/IAI.00230-06>.
- Cerca, Nuno, Tomás Maira-Litrán, Kimberly K. Jefferson, Martha Grout, Donald A. Goldmann, et Gerald B. Pier. 2007. « Protection against Escherichia Coli Infection by Antibody to the Staphylococcus Aureus Poly-N-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (18): 7528- 33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700630104>.
- Céspedes, Sandra, Waleska Saitz, Felipe Del Canto, Marjorie De la Fuente, Rodrigo Quera, Marcela Hermoso, Raúl Muñoz, et al. 2017. « Genetic Diversity and Virulence Determinants of Escherichia Coli Strains Isolated from Patients with Crohn's Disease in Spain and Chile ». *Frontiers in Microbiology* 8: 639. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00639>.

- Chai, Yunrong, Frances Chu, Roberto Kolter, et Richard Losick. 2008. « Bistability and Biofilm Formation in *Bacillus subtilis* ». *Molecular microbiology* 67 (2): 254- 63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06040.x>.
- Chakraborty, Smarajit, Hideaki Mizusaki, et Linda J. Kenney. 2015. « A FRET-Based DNA Biosensor Tracks OmpR-Dependent Acidification of Salmonella during Macrophage Infection ». *PLoS Biology* 13 (4): e1002116. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002116>.
- Chargui, Abderrahman, Annabelle Cesaro, Sanda Mimouna, Mohamed Fareh, Patrick Brest, Philippe Naquet, Arlette Darfeuille-Michaud, et al. 2012. « Subversion of Autophagy in Adherent Invasive Escherichia coli-Infected Neutrophils Induces Inflammation and Cell Death ». *PLoS ONE* 7 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051727>.
- Chassaing, Benoit, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2013. « The ΣE Pathway Is Involved in Biofilm Formation by Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia Coli ». *Journal of Bacteriology* 195 (1): 76- 84. <https://doi.org/10.1128/JB.01079-12>.
- Chastellier, C. de, et L. Thilo. 1997. « Phagosome Maturation and Fusion with Lysosomes in Relation to Surface Property and Size of the Phagocytic Particle ». *European Journal of Cell Biology* 74 (1): 49- 62.
- Chauvaux, Sylvie, Marie-Laure Rosso, Lionel Frangeul, Céline Lacroix, Laurent Labarre, Angèle Schiavo, Michaël Marceau, et al. 2007. « Transcriptome Analysis of Yersinia Pestis in Human Plasma: An Approach for Discovering Bacterial Genes Involved in Septicaemic Plague ». *Microbiology (Reading, England)* 153 (Pt 9): 3112- 24. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/006213-0>.
- Choi, Augustine M. K., Stefan W. Ryter, et Beth Levine. 2013. « Autophagy in Human Health and Disease ». *The New England Journal of Medicine* 368 (7): 651- 62. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1205406>.
- Christie, Peter J., et Eric Cascales. 2005. « Structural and dynamic properties of bacterial Type IV secretion systems (Review) ». *Molecular membrane biology* 22 (0): 51- 61.
- Chu, Eric K., Onur Kilic, Hojung Cho, Alex Groisman, et Andre Levchenko. 2018. « Self-Induced Mechanical Stress Can Trigger Biofilm Formation in Uropathogenic Escherichia Coli ». *Nature Communications* 9 (1): 1- 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06552-z>.
- Claudi, Beatrice, Petra Spröte, Anna Chirkova, Nicolas Personnic, Janine Zankl, Nura Schürmann, Alexander Schmidt, et Dirk Bumann. 2014. « Phenotypic Variation of Salmonella in Host Tissues Delays Eradication by Antimicrobial Chemotherapy ». *Cell* 158 (4): 722- 33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.045>.
- Clausen, Tim, Chris Southan, et Michael Ehrmann. 2002. « The HtrA Family of Proteases: Implications for Protein Composition and Cell Fate ». *Molecular Cell* 10 (3): 443- 55. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00658-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00658-5).
- Cogger-Ward, Robert, Adam Collins, Denise McLean, Jacob Dehinsilu, et Alan Huett. 2019. « A Conserved Protein, BcmA, Mediates Motility, Biofilm Formation, and Host Colonisation in Adherent Invasive Escherichia Coli ». *BioRxiv*, avril, 606798. <https://doi.org/10.1101/606798>.
- Cohen, Nadia R., Michael A. Lobritz, et James J. Collins. 2013. « Microbial Persistence and the Road to Drug Resistance ». *Cell Host & Microbe* 13 (6): 632- 42. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.009>.
- Collins, Adam, et Alan Huett. 2018. « A Multi-Phenotypic Imaging Screen to Identify Bacterial Effectors by Exogenous Expression in a HeLa Cell Line ». *Scientific Data* 5: 180081. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.81>.
- Colvin, Kelly M., Vernita D. Gordon, Keiji Murakami, Bradley R. Borlee, Daniel J. Wozniak, Gerard C. L. Wong, et Matthew R. Parsek. 2011. « The Pel Polysaccharide Can Serve a Structural and Protective Role in the Biofilm Matrix of Pseudomonas Aeruginosa ». *PLoS Pathogens* 7 (1): e1001264. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001264>.
- Conte, Maria P., Marta Aleandri, Massimiliano Marazzato, Antonietta L. Conte, Cecilia Ambrosi, Mauro Nicoletti, Carlo Zagaglia, et al. 2016. « The Adherent/Invasive Escherichia Coli Strain LF82 Invades and Persists in Human Prostate Cell Line RWPE-1, Activating a Strong Inflammatory Response ». *Infection and Immunity* 84 (11): 3105- 13. <https://doi.org/10.1128/IAI.00438-16>.
- Cornelis, Guy R. 2006. « The Type III Secretion Injectisome ». *Nature Reviews Microbiology* 4 (11): 811- 25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1526>.
- Cossart, P, et M Lecuit. 1998. « Interactions of Listeria monocytogenes with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. » *The EMBO Journal* 17 (14): 3797- 3806. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.14.3797>.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, et E. P. Greenberg. 1999. « Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections ». *Science (New York, N.Y.)* 284 (5418): 1318- 22. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>.

- Coulthurst, Sarah J. 2013. « The Type VI secretion system – a widespread and versatile cell targeting system ». *Research in Microbiology*, Bacterial secretion systems: function and structural biology, 164 (6): 640- 54. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.017>.
- Crichton, R. R., et M. Charlotheaux-Wauters. 1987. « Iron Transport and Storage ». *European Journal of Biochemistry* 164 (3): 485- 506. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb11155.x>.
- Crosa, Jorge H., et Christopher T. Walsh. 2002. « Genetics and Assembly Line Enzymology of Siderophore Biosynthesis in Bacteria ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (2): 223- 49. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.2.223-249.2002>.
- Croxen, Matthew A., Robyn J. Law, Roland Scholz, Kristie M. Keeney, Marta Wlodarska, et B. Brett Finlay. 2013. « Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia Coli ». *Clinical Microbiology Reviews* 26 (4): 822- 80. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>.
- Da Re, Sandra, et Jean-Marc Ghigo. 2006. « A CsgD-Independent Pathway for Cellulose Production and Biofilm Formation in Escherichia coli ». *Journal of Bacteriology* 188 (8): 3073- 87. <https://doi.org/10.1128/JB.188.8.3073-3087.2006>.
- Danese, Paul N., Leslie A. Pratt, et Roberto Kolter. 2000. « Exopolysaccharide Production Is Required for Development of Escherichia coli K-12 Biofilm Architecture ». *Journal of Bacteriology* 182 (12): 3593- 96.
- Darfeuille-Michaud, A., C. Neut, N. Barnich, E. Lederman, P. Di Martino, P. Desreumaux, L. Gambiez, B. Joly, A. Cortot, et J. F. Colombel. 1998. « Presence of Adherent Escherichia Coli Strains in Ileal Mucosa of Patients with Crohn's Disease ». *Gastroenterology* 115 (6): 1405- 13. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70019-8](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70019-8).
- Darfeuille-Michaud, Arlette. 2002. « Adherent-invasive Escherichia coli: a putative new E. coli pathotype associated with Crohn's disease ». *International Journal of Medical Microbiology* 292 (3): 185- 93. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00201>.
- Darfeuille-Michaud, Arlette, Jérôme Boudeau, Philippe Bulois, Christel Neut, Anne-Lise Glasser, Nicolas Barnich, Marie-Agnès Bringer, Alexander Swidsinski, Laurent Beaugerie, et Jean-Frédéric Colombel. 2004. « High Prevalence of Adherent-Invasive Escherichia Coli Associated with Ileal Mucosa in Crohn's Disease ». *Gastroenterology* 127 (2): 412- 21. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.04.061>.
- Davies, David G., et Cláudia N. H. Marques. 2009. « A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms ». *Journal of Bacteriology* 191 (5): 1393- 1403. <https://doi.org/10.1128/JB.01214-08>.
- Dean, Paul. 2011. « Functional Domains and Motifs of Bacterial Type III Effector Proteins and Their Roles in Infection ». *FEMS Microbiology Reviews* 35 (6): 1100- 1125. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00271.x>.
- Denning, Timothy L, Yi-chong Wang, Seema R Patel, Ifor R Williams, et Bali Pulendran. 2007. « Lamina Propria Macrophages and Dendritic Cells Differentially Induce Regulatory and Interleukin 17–Producing T Cell Responses ». *Nature Immunology* 8 (10): 1086- 94. <https://doi.org/10.1038/ni1511>.
- DePas, William H., David A. Hufnagel, John S. Lee, Luz P. Blanco, Hans C. Bernstein, Steve T. Fisher, Garth A. James, Philip S. Stewart, et Matthew R. Chapman. 2013. « Iron induces bimodal population development by Escherichia coli ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (7): 2629- 34. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218703110>.
- Desai, M., T. Bühler, P. H. Weller, et M. R. Brown. 1998. « Increasing Resistance of Planktonic and Biofilm Cultures of Burkholderia Cepacia to Ciprofloxacin and Ceftazidime during Exponential Growth ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 42 (2): 153- 60. <https://doi.org/10.1093/jac/42.2.153>.
- Dikshit, Neha, Pradeep Bist, Shannon N. Fenlon, Niyas Kudukkil Pulloor, Christelle En Lin Chua, Marci A. Scidmore, Jason A. Carlyon, Bor Luen Tang, Swaine L. Chen, et Bindu Sukumaran. 2015. « Intracellular Uropathogenic E. coli Exploits Host Rab35 for Iron Acquisition and Survival within Urinary Bladder Cells ». *PLoS Pathogens* 11 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005083>.
- Dogan, Belgin, Haruo Suzuki, Deepali Herlekar, R. Balfour Sartor, Barry J. Campbell, Carol L. Roberts, Katrina Stewart, et al. 2014. « Inflammation-associated Adherent-invasive Escherichia coli Are Enriched in Pathways for Use of Propanediol and Iron and M-cell Translocation ». *Inflammatory Bowel Diseases* 20 (11): 1919- 32. <https://doi.org/10.1097/MIB.000000000000183>.
- Donlan, Rodney M. 2002. « Biofilms: Microbial Life on Surfaces ». *Emerging Infectious Diseases* 8 (9): 881- 90. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>.
- Donlan, Rodney M., et J. William Costerton. 2002. « Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms ». *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2): 167- 93. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>.

- Donskey, Curtis J., Sirisha Kundrapu, et Abhishek Deshpande. 2015. « Colonization versus Carriage of *Clostridium Difficile* ». *Infectious Disease Clinics of North America* 29 (1): 13- 28. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2014.11.001>.
- Dörr, Tobias, Kim Lewis, et Marin Vulić. 2009. « SOS Response Induces Persistence to Fluoroquinolones in *Escherichia coli* ». *PLoS Genetics* 5 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000760>.
- Dörr, Tobias, Marin Vulić, et Kim Lewis. 2010. « Ciprofloxacin Causes Persister Formation by Inducing the TisB toxin in *Escherichia coli* ». *PLoS Biology* 8 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000317>.
- Drecktrah, Dan, Leigh A Knodler, Dale Howe, et Olivia Steele-Mortimer. 2007. « Salmonella Trafficking is Defined by Continuous Dynamic Interactions with the Endolysosomal System ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8 (3): 212- 25. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00529.x>.
- Dreux, Nicolas, Jérémy Denizot, Margarita Martinez-Medina, Alexander Mellmann, Maria Billig, Dagmara Kisiela, Sujay Chattopadhyay, et al. 2013. « Point Mutations in FimH Adhesin of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Enhance Intestinal Inflammatory Response ». *PLoS Pathogens* 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003141>.
- Duguid, I. G., E. Evans, M. R. Brown, et P. Gilbert. 1992. « Growth-Rate-Independent Killing by Ciprofloxacin of Biofilm-Derived *Staphylococcus Epidermidis*; Evidence for Cell-Cycle Dependency ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 30 (6): 791- 802. <https://doi.org/10.1093/jac/30.6.791>.
- Dunne, Karl A., Amr Allam, Anne McIntosh, Stephanie A. Houston, Vuk Cerovic, Carl S. Goodyear, Andrew J. Roe, et al. 2013. « Increased S-Nitrosylation and Proteasomal Degradation of Caspase-3 during Infection Contribute to the Persistence of Adherent Invasive *Escherichia coli* (AIEC) in Immune Cells ». *PLoS ONE* 8 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068386>.
- Dunne, W. Michael. 2002. « Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? ». *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2): 155- 66. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.155-166.2002>.
- Eaves-Pyles, Tonya, Christopher A. Allen, Joanna Taormina, Alexander Swidsinski, Christopher B. Tutt, G. Eric Jezek, Martha Islas-Islas, et Alfredo G. Torres. 2008. « *Escherichia coli* isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells ». *International Journal of Medical Microbiology* 298 (5): 397- 409. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.05.011>.
- Eisele, Nicholas A., Thomas Ruby, Amanda Jacobson, Paolo S. Manzanillo, Jeffery S. Cox, Lilian Lam, Lata Mukundan, Ajay Chawla, et Denise M. Monack. 2013. « Salmonella Require the Fatty Acid Regulator PPAR δ for the Establishment of a Metabolic Environment Essential for Long-Term Persistence ». *Cell Host & Microbe* 14 (2): 171- 82. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.010>.
- Ellermann, Melissa, Eun Young Huh, Bo Liu, Ian M. Carroll, Rita Tamayo, et R. Balfour Sartor. 2015. « Adherent-Invasive *Escherichia coli* Production of Cellulose Influences Iron-Induced Bacterial Aggregation, Phagocytosis, and Induction of Colitis ». *Infection and Immunity* 83 (10): 4068- 80. <https://doi.org/10.1128/IAI.00904-15>.
- Ellermann, Melissa, et R. Balfour Sartor. 2018. « Intestinal bacterial biofilms modulate mucosal immune responses ». *Journal of immunological sciences* 2 (2): 13- 18.
- Engle, Matthias, Elmar Stöbel, Kirstin Castiglione, Nives Schwerdtner, Manfred Wagner, Pal Bölskei, Martin Röllinghoff, et Steffen Stenger. 2002. « Induction of TNF in Human Alveolar Macrophages As a Potential Evasion Mechanism of Virulent *Mycobacterium Tuberculosis* ». *The Journal of Immunology* 168 (3): 1328- 37. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.3.1328>.
- Engledow, Amanda S., Enrique G. Medrano, Eshwar Mahenthalingam, John J. LiPuma, et Carlos F. Gonzalez. 2004. « Involvement of a Plasmid-Encoded Type IV Secretion System in the Plant Tissue Watersoaking Phenotype of *Burkholderia Cenocepacia* ». *Journal of Bacteriology* 186 (18): 6015- 24. <https://doi.org/10.1128/JB.186.18.6015-6024.2004>.
- Enos-Berlage, Jodi L., Zehra T. Guvener, Carrie E. Keenan, et Linda L. McCarter. 2005. « Genetic Determinants of Biofilm Development of Opaque and Translucent *Vibrio Parahaemolyticus* ». *Molecular Microbiology* 55 (4): 1160- 82. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04453.x>.
- Evans, Margery L., Erik Chorell, Jonathan D. Taylor, Jörgen Åden, Anna Götheson, Fei Li, Marion Koch, et al. 2015. « The Bacterial Curli System Possesses a Potent and Selective Inhibitor of Amyloid Formation ». *Molecular Cell* 57 (3): 445- 55. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.025>.
- Eylert, Eva, Jennifer Schär, Sonja Mertins, Regina Stoll, Adelbert Bacher, Werner Goebel, et Wolfgang Eisenreich. 2008. « Carbon Metabolism of *Listeria Monocytogenes* Growing inside Macrophages ». *Molecular Microbiology* 69 (4): 1008- 17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06337.x>.
- Fahlgren, A., V. Baranov, L. Frängsmyr, F. Zoubir, M.-L. Hammarström, et S. Hammarström. 2003. « Interferon-Gamma Tempers the Expression of Carcinoembryonic Antigen Family Molecules in Human Colon Cells:

- A Possible Role in Innate Mucosal Defence ». *Scandinavian Journal of Immunology* 58 (6): 628- 41. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2003.01342.x>.
- Falla, Timothy J., et Ian Chopra. 1998. « Joint Tolerance to β -Lactam and Fluoroquinolone Antibiotics in Escherichia Coli Results from Overexpression of HipA ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (12): 3282- 84. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.12.3282>.
- Figueira, Rita, Kathryn G. Watson, David W. Holden, et Sophie Helaine. 2013. « Identification of Salmonella Pathogenicity Island-2 Type III Secretion System Effectors Involved in Intramacrophage Replication of S. enterica Serovar Typhimurium: Implications for Rational Vaccine Design ». *mBio* 4 (2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00065-13>.
- Fink, Susan L., et Brad T. Cookson. 2005. « Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells ». *Infection and Immunity* 73 (4): 1907- 16. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>.
- Fisher, Robert A., Bridget Gollan, et Sophie Helaine. 2017. « Persistent Bacterial Infections and Persister Cells ». *Nature Reviews Microbiology* 15 (8): 453- 64. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>.
- Flannagan, Ronald S., Gabriela Cosío, et Sergio Grinstein. 2009. « Antimicrobial Mechanisms of Phagocytes and Bacterial Evasion Strategies ». *Nature Reviews Microbiology* 7 (5): 355- 66. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2128>.
- Flemming, Hans-Curt, et Jost Wingender. 2010a. « The Biofilm Matrix ». *Nature Reviews Microbiology* 8 (9): 623- 33. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
- . 2010b. « The Biofilm Matrix ». *Nature Reviews. Microbiology* 8 (9): 623- 33. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
- Flemming, Hans-Curt, Jost Wingender, Ulrich Szewzyk, Peter Steinberg, Scott A. Rice, et Staffan Kjelleberg. 2016. « Biofilms: An Emergent Form of Bacterial Life ». *Nature Reviews Microbiology* 14 (9): 563- 75. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>.
- Fong, Jiunn N. C., et Fitnat H. Yildiz. 2015. « Biofilm Matrix Proteins ». *Microbiology spectrum* 3 (2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014>.
- Foxman, B., L. Zhang, P. Tallman, K. Palin, C. Rode, C. Bloch, B. Gillespie, et C. F. Marrs. 1995. « Virulence Characteristics of Escherichia Coli Causing First Urinary Tract Infection Predict Risk of Second Infection ». *The Journal of Infectious Diseases* 172 (6): 1536- 41. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1536>.
- Foxman, Betsy. 2003. « Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs ». *Disease-a-Month* 49 (2): 53- 70. <https://doi.org/10.1067/mda.2003.7>.
- Franklin, Michael J., David E. Nivens, Joel T. Weadge, et P. Lynne Howell. 2011. « Biosynthesis of the Pseudomonas Aeruginosa Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl ». *Frontiers in Microbiology* 2: 167. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00167>.
- Fridman, Ofer, Amir Goldberg, Irine Ronin, Noam Shoresh, et Nathalie Q. Balaban. 2014. « Optimization of Lag Time Underlies Antibiotic Tolerance in Evolved Bacterial Populations ». *Nature* 513 (7518): 418- 21. <https://doi.org/10.1038/nature13469>.
- Fung, Danny K. C., Edward W. C. Chan, Miu L. Chin, et Raphael C. Y. Chan. 2010. « Delineation of a Bacterial Starvation Stress Response Network Which Can Mediate Antibiotic Tolerance Development ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (3): 1082- 93. <https://doi.org/10.1128/AAC.01218-09>.
- Gama-Castro, Socorro, Heladia Salgado, Alberto Santos-Zavaleta, Daniela Ledezma-Tejeida, Luis Muñiz-Rascado, Jair Santiago García-Sotelo, Kevin Alquicira-Hernández, et al. 2016. « RegulonDB Version 9.0: High-Level Integration of Gene Regulation, Coexpression, Motif Clustering and Beyond ». *Nucleic Acids Research* 44 (D1): D133-143. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1156>.
- Ganeshan, Kirthana, et Ajay Chawla. 2014. « Metabolic Regulation of Immune Responses ». *Annual Review of Immunology* 32: 609- 34. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120236>.
- Gibold, Lucie, Estelle Garenaux, Guillaume Dalmasso, Camille Gallucci, David Cia, Benoit Mottet-Auselo, Tiphanie Fais, et al. 2016. « The Vat-AIEC protease promotes crossing of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated Escherichia coli ». *Cellular Microbiology* 18 (5): 617- 31. <https://doi.org/10.1111/cmi.12539>.
- Glasser, Anne-Lise, Jerome Boudeau, Nicolas Barnich, Marie-Helene Perruchot, Jean-Frederic Colombel, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2001. « Adherent Invasive Escherichia Coli Strains from Patients with Crohn's Disease Survive and Replicate within Macrophages without Inducing Host Cell Death ». *Infection and Immunity* 69 (9): 5529- 37. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5529-5537.2001>.
- Goetz, David H, Margaret A Holmes, Niels Borregaard, Martin E Bluhm, Kenneth N Raymond, et Roland K Strong. 2002. « The Neutrophil Lipocalin NGAL Is a Bacteriostatic Agent that Interferes with

- Siderophore-Mediated Iron Acquisition ». *Molecular Cell* 10 (5): 1033- 43. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00708-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00708-6).
- Gomez, James E., et John D. McKinney. 2004. « M. Tuberculosis Persistence, Latency, and Drug Tolerance ». *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 84 (1- 2): 29- 44.
- González, Juan F, Mark M Hahn, et John S Gunn. 2018. « Chronic biofilm-based infections: skewing of the immune response ». *Pathogens and Disease* 76 (3). <https://doi.org/10.1093/femspd/fty023>.
- Goodman, Andrew L., Bridget Kulasekara, Arne Rietsch, Dana Boyd, Roger S. Smith, et Stephen Lory. 2004. « A Signaling Network Reciprocally Regulates Genes Associated with Acute Infection and Chronic Persistence in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Developmental Cell* 7 (5): 745- 54. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.08.020>.
- Goodrich, Julia K., Emily R. Davenport, Michelle Beaumont, Matthew A. Jackson, Rob Knight, Carole Ober, Tim D. Spector, Jordana T. Bell, Andrew G. Clark, et Ruth E. Ley. 2016. « Genetic determinants of the gut microbiome in UK Twins ». *Cell host & microbe* 19 (5): 731- 43. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.017>.
- Goormaghtigh, Frédéric, Nathan Fraikin, Marta Putrinš, Thibaut Hallaert, Vasili Haurlyuk, Abel Garcia-Pino, Andreas Sjödin, et al. 2018. « Reassessing the Role of Type II Toxin-Antitoxin Systems in Formation of *Escherichia Coli* Type II Persister Cells ». *MBio* 9 (3): e00640-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00640-18>.
- Graham, Joseph G., Laura J. MacDonald, S. Kauser Hussain, Uma M. Sharma, Richard C. Kurten, et Daniel E. Voth. 2013. « Virulent *Coxiella Burnetii* Pathotypes Productively Infect Primary Human Alveolar Macrophages ». *Cellular Microbiology* 15 (6): 1012- 25. <https://doi.org/10.1111/cmi.12096>.
- Grant, Matthew A. A., Bartłomiej Waclaw, Rosalind J. Allen, et Pietro Cicuta. 2014. « The role of mechanical forces in the planar-to-bulk transition in growing *Escherichia coli* microcolonies ». *Journal of The Royal Society Interface* 11 (97): 20140400. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0400>.
- Greub, Gilbert, et Didier Raoult. 2004. « Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae ». *Clinical Microbiology Reviews* 17 (2): 413- 33. <https://doi.org/10.1128/cmr.17.2.413-433.2004>.
- Grohmann, Elisabeth, Peter J. Christie, Gabriel Waksman, et Steffen Backert. 2018. « Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria ». *Molecular microbiology* 107 (4): 455- 71. <https://doi.org/10.1111/mmi.13896>.
- Gualdi, Luciana, Letizia Tagliabue, Stefano Bertagnoli, Teresa Ieranò, Cristina De Castro, et Paolo Landini. 2008. « Cellulose Modulates Biofilm Formation by Counteracting Curli-Mediated Colonization of Solid Surfaces in *Escherichia Coli* ». *Microbiology (Reading, England)* 154 (Pt 7): 2017- 24. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/018093-0>.
- Guillier, Maude, et Susan Gottesman. 2006. « Remodelling of the *Escherichia Coli* Outer Membrane by Two Small Regulatory RNAs ». *Molecular Microbiology* 59 (1): 231- 47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04929.x>.
- . 2008. « The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator ». *Nucleic Acids Research* 36 (21): 6781- 94. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn742>.
- Gunther, Nereus W., Jennifer A. Snyder, Virginia Lockett, Ian Blomfield, David E. Johnson, et Harry L. T. Mobley. 2002. « Assessment of Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli* Type 1 Fimbrial Mutants in Which the Invertible Element Is Phase-Locked On or Off ». *Infection and Immunity* 70 (7): 3344- 54. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3344-3354.2002>.
- Gupta, Kajal, Julie Liao, Olga E. Petrova, K. E. Cherny, et Karin Sauer. 2014. « Elevated Levels of the Second Messenger C-Di-GMP Contribute to Antimicrobial Resistance of *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Molecular Microbiology* 92 (3): 488- 506. <https://doi.org/10.1111/mmi.12587>.
- Halaas, Oyvind, Magnus Steigedal, Markus Haug, Jane A. Awuh, Liv Ryan, Andreas Brech, Shintaro Sato, et al. 2010. « Intracellular *Mycobacterium Avium* Intersect Transferrin in the Rab11(+) Recycling Endocytic Pathway and Avoid Lipocalin 2 Trafficking to the Lysosomal Pathway ». *The Journal of Infectious Diseases* 201 (5): 783- 92. <https://doi.org/10.1086/650493>.
- Hall-Stoodley, Luanne, J. William Costerton, et Paul Stoodley. 2004. « Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases ». *Nature Reviews Microbiology* 2 (2): 95- 108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>.
- Hammarström, Sten, et Vladimir Baranov. 2001. « Is there a role for CEA in innate immunity in the colon? ». *Trends in Microbiology* 9 (3): 119- 25. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)01952-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)01952-7).
- Hammerschlag, Margaret R. 2002. « The intracellular life of chlamydiae ». *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 13 (4): 239- 48. <https://doi.org/10.1053/spid.2002.127201>.

- Hancock, Viktoria, Lionel Ferrières, et Per Klemm. 2008. « The Ferric Yersiniabactin Uptake Receptor FyuA Is Required for Efficient Biofilm Formation by Urinary Tract Infectious Escherichia Coli in Human Urine ». *Microbiology (Reading, England)* 154 (Pt 1): 167- 75. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011981-0>.
- Hantke, K. 1981. « Regulation of Ferric Iron Transport in Escherichia Coli K12: Isolation of a Constitutive Mutant ». *Molecular & General Genetics: MGG* 182 (2): 288- 92. <https://doi.org/10.1007/bf00269672>.
- Haraoka, Masashi, Long Hang, Björn Frendéus, Gabriela Godaly, Marie Burdick, Robert Strieter, et Catharina Svanborg. 1999. « Neutrophil Recruitment and Resistance to Urinary Tract Infection ». *The Journal of Infectious Diseases* 180 (4): 1220- 29. <https://doi.org/10.1086/315006>.
- Harms, Alexander, Ditlev Egeskov Brodersen, Namiko Mitarai, et Kenn Gerdes. 2018. « Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology ». *Molecular Cell* 70 (5): 768- 84. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.003>.
- Harms, Alexander, Cinzia Fino, Michael A. Sørensen, Szabolcs Semsey, et Kenn Gerdes. 2017. « Prophages and Growth Dynamics Confound Experimental Results with Antibiotic-Tolerant Persister Cells ». *mBio* 8 (6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01964-17>.
- Harms, Alexander, Etienne Maisonneuve, et Kenn Gerdes. 2016. « Mechanisms of Bacterial Persistence during Stress and Antibiotic Exposure ». *Science* 354 (6318): aaf4268. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4268>.
- Haurlyuk, Vasili, Gemma C. Atkinson, Katsuhiko S. Murakami, Tanel Tenson, et Kenn Gerdes. 2015. « Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology ». *Nature reviews. Microbiology* 13 (5): 298- 309. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3448>.
- Hawy, A. M. el, M. M. Abdel Rahman, S. Rozik, A. F. Fawzy, et H. A. el Gammal. 1993. « Assessment of Serum Copper and Zinc Levels in Chronic Schistosoma Mansonii Patients with and without Hepatic Involvement before and after Praziquantel Therapy ». *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 23 (1): 55- 62.
- Hayek, Inaya, Christian Berens, et Anja Lührmann. 2019. « Modulation of host cell metabolism by T4SS-encoding intracellular pathogens ». *Current Opinion in Microbiology, Host-microbe interactions: bacteria*, edited by Karen M. Ottemann & Linda J. Kenney, 47 (février): 59- 65. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.11.010>.
- Helaine, Sophie, Angela M. Cheverton, Kathryn G. Watson, Laura M. Faure, Sophie A. Matthews, et David W. Holden. 2014. « Internalization of Salmonella by Macrophages Induces Formation of Nonreplicating Persisters ». *Science (New York, N.Y.)* 343 (6167): 204- 8. <https://doi.org/10.1126/science.1244705>.
- Helaine, Sophie, Jessica A. Thompson, Kathryn G. Watson, Mei Liu, Cliona Boyle, et David W. Holden. 2010. « Dynamics of Intracellular Bacterial Replication at the Single Cell Level ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (8): 3746- 51. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000041107>.
- Henderson, Jeffrey P., Jan R. Crowley, Jerome S. Pinkner, Jennifer N. Walker, Pablo Tsukayama, Walter E. Stamm, Thomas M. Hooton, et Scott J. Hultgren. 2009. « Quantitative Metabolomics Reveals an Epigenetic Blueprint for Iron Acquisition in Uropathogenic Escherichia Coli ». *PLoS Pathogens* 5 (2): e1000305. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000305>.
- Henry, Rebecca, Lee Shaughnessy, Martin J. Loessner, Christine Alberti-Segui, Darren E. Higgins, et Joel A. Swanson. 2006. « Cytolysin-dependent delay of vacuole maturation in macrophages infected with Listeria monocytogenes ». *Cellular microbiology* 8 (1): 107- 19. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00604.x>.
- Heras, Begoña, Stephen R. Shouldice, Makrina Totsika, Martin J. Scanlon, Mark A. Schembri, et Jennifer L. Martin. 2009. « DSB Proteins and Bacterial Pathogenicity ». *Nature Reviews Microbiology* 7 (3): 215- 25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2087>.
- Hiemstra, Ida H, Marieke R Beijer, Henrike Veninga, Kim Vrijland, Ellen G F Borg, Brenda J Olivier, Reina E Mebius, Georg Kraal, et Joke M M den Haan. 2014. « The identification and developmental requirements of colonic CD169+ macrophages ». *Immunology* 142 (2): 269- 78. <https://doi.org/10.1111/imm.12251>.
- Hilbi, Hubert, Gil Segal, et Howard A. Shuman. 2001. « Icm/Dot-Dependent Upregulation of Phagocytosis by Legionella Pneumophila ». *Molecular Microbiology* 42 (3): 603- 17. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02645.x>.
- Hipolito, Victoria E. B., Erika Ospina-Escobar, et Roberto J. Botelho. 2018. « Lysosome Remodelling and Adaptation during Phagocyte Activation ». *Cellular Microbiology* 20 (4): e12824. <https://doi.org/10.1111/cmi.12824>.

- Hobley, Laura, Catriona Harkins, Cait E. MacPhee, et Nicola R. Stanley-Wall. 2015. « Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes ». *FEMS Microbiology Reviews* 39 (5): 649- 69. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv015>.
- Hofsteenge, Niels, Erik van Nimwegen, et Olin K. Silander. 2013. « Quantitative Analysis of Persister Fractions Suggests Different Mechanisms of Formation among Environmental Isolates of E. Coli ». *BMC Microbiology* 13 (février): 25. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-25>.
- Holden, Victoria I., et Michael A. Bachman. 2015. « Diverging Roles of Bacterial Siderophores during Infection ». *Metallomics: Integrated Biometal Science* 7 (6): 986- 95. <https://doi.org/10.1039/c4mt00333k>.
- Hooton, T. M., et W. E. Stamm. 1997. « Diagnosis and Treatment of Uncomplicated Urinary Tract Infection ». *Infectious Disease Clinics of North America* 11 (3): 551- 81.
- Hu, P., J. Elliott, P. McCready, E. Skowronski, J. Garnes, A. Kobayashi, R. R. Brubaker, et E. Garcia. 1998. « Structural Organization of Virulence-Associated Plasmids of Yersinia Pestis ». *Journal of Bacteriology* 180 (19): 5192- 5202.
- Huang, Bernice, Andree Hubber, Justin A. McDonough, Craig R. Roy, Marci A. Scidmore, et Jason A. Carlyon. 2010. « The Anaplasma Phagocytophilum-Occupied Vacuole Selectively Recruits Rab-GTPases That Are Predominantly Associated with Recycling Endosomes ». *Cellular Microbiology* 12 (9): 1292- 1307. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01468.x>.
- Hunstad, David A., et Sheryl S. Justice. 2010. « Intracellular Lifestyles and Immune Evasion Strategies of Uropathogenic Escherichia coli ». *Annual Review of Microbiology* 64 (1): 203- 21. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134258>.
- Huynh, Cassidy K., Eeva-Liisa Eskelinen, Cameron C. Scott, Anatoly Malevanets, Paul Saftig, et Sergio Grinstein. 2007. « LAMP Proteins Are Required for Fusion of Lysosomes with Phagosomes ». *The EMBO Journal* 26 (2): 313- 24. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601511>.
- Hvidberg, Hanne, Carsten Struve, Karen A. Krogfelt, Nils Christensen, Søren N. Rasmussen, et Niels Frimodt-Møller. 2000. « Development of a Long-Term Ascending Urinary Tract Infection Mouse Model for Antibiotic Treatment Studies ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (1): 156- 63.
- Ishikawa, Hirokazu, Hironori Otaka, Kimika Maki, Teppei Morita, et Hiroji Aiba. 2012. « The Functional Hfq-Binding Module of Bacterial SRNAs Consists of a Double or Single Hairpin Preceded by a U-Rich Sequence and Followed by a 3' Poly(U) Tail ». *RNA (New York, N.Y.)* 18 (5): 1062- 74. <https://doi.org/10.1261/rna.031575.111>.
- Itoh, Yoshikane, John D. Rice, Carlos Goller, Archana Pannuri, Jeannette Taylor, Jeffrey Meisner, Terry J. Beveridge, James F. Preston, et Tony Romeo. 2008. « Roles of pgaABCD Genes in Synthesis, Modification, and Export of the Escherichia coli Biofilm Adhesin Poly- β -1,6-N-Acetyl-d-Glucosamine ». *Journal of Bacteriology* 190 (10): 3670- 80. <https://doi.org/10.1128/JB.01920-07>.
- Iwasaki, Akiko, et Ruslan Medzhitov. 2015. « Control of adaptive immunity by the innate immune system ». *Nature immunology* 16 (4): 343- 53. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>.
- Izano, Era A., Irina Sadovskaya, Evgeny Vinogradov, Martha H. Mulks, Kabilan Velliyagounder, Chandran Ragunath, William B. Kher, et al. 2007. « Poly-N-Acetylglucosamine Mediates Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in Actinobacillus Pleuropneumoniae ». *Microbial Pathogenesis* 43 (1): 1- 9. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.02.004>.
- Jacob-Dubuisson, F., J. Pinkner, Z. Xu, R. Striker, A. Padmanabhan, et S. J. Hultgren. 1994. « PapD Chaperone Function in Pilus Biogenesis Depends on Oxidant and Chaperone-like Activities of DsbA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (24): 11552- 56. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11552>.
- Jacobson, S. H., I. Kühn, et A. Brauner. 1992. « Biochemical Fingerprinting of Urinary Escherichia Coli Causing Recurrent Infections in Women with Pyelonephritic Renal Scarring ». *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 26 (4): 373- 77. <https://doi.org/10.3109/00365599209181229>.
- Jamal, Muhsin, Wisal Ahmad, Saadia Andleeb, Fazal Jalil, Muhammad Imran, Muhammad Asif Nawaz, Tahir Hussain, Muhammad Ali, Muhammad Rafiq, et Muhammad Atif Kamil. 2018. « Bacterial biofilm and associated infections ». *Journal of the Chinese Medical Association* 81 (1): 7- 11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>.
- Janion, C. 2001. « Some Aspects of the SOS Response System--a Critical Survey ». *Acta Biochimica Polonica* 48 (3): 599- 610.
- Jarry, A., L. Crémet, N. Caroff, C. Bou-Hanna, J. M. Mussini, A. Reynaud, A. L. Servin, J. F. Mosnier, V. Liévin-Le Moal, et C. L. Laboisse. 2015. « Subversion of Human Intestinal Mucosa Innate Immunity by a Crohn's Disease-Associated E. Coli ». *Mucosal Immunology* 8 (3): 572- 81. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.89>.
- Jenal, Urs, Alberto Reinders, et Christian Lori. 2017. « Cyclic Di-GMP: Second Messenger Extraordinaire ». *Nature Reviews Microbiology* 15 (5): 271- 84. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.190>.

- Jensen, Peter Ø, Thomas Bjarnsholt, Richard Phipps, Thomas B. Rasmussen, Henrik Calum, Lars Christoffersen, Claus Moser, et al. 2007. « Rapid Necrotic Killing of Polymorphonuclear Leukocytes Is Caused by Quorum-Sensing-Controlled Production of Rhamnolipid by *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Microbiology (Reading, England)* 153 (Pt 5): 1329- 38. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003863-0>.
- Johnson, M K, et D Boese-Marrazzo. 1980. « Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. » *Infection and Immunity* 29 (3): 1028- 33.
- Jolivet-Gougeon, Anne, et Martine Bonnaure-Mallet. 2014. « Biofilms as a mechanism of bacterial resistance ». *Drug Discovery Today: Technologies*, Drug Resistance, 11 (mars): 49- 56. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.003>.
- Joo, Hwang-Soo, et Michael Otto. 2012. « Molecular Basis of in Vivo Biofilm Formation by Bacterial Pathogens ». *Chemistry & Biology* 19 (12): 1503- 13. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.10.022>.
- Journet, Laure, Céline Agrain, Petr Broz, et Guy R. Cornelis. 2003. « The Needle Length of Bacterial Injectisomes Is Determined by a Molecular Ruler ». *Science (New York, N.Y.)* 302 (5651): 1757- 60. <https://doi.org/10.1126/science.1091422>.
- Justice, Sheryl S., Chia Hung, Julie A. Theriot, Daniel A. Fletcher, Gregory G. Anderson, Matthew J. Footer, et Scott J. Hultgren. 2004. « Differentiation and Developmental Pathways of Uropathogenic *Escherichia Coli* in Urinary Tract Pathogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (5): 1333- 38. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308125100>.
- Kagan, Jonathan C., et Craig R. Roy. 2002. « *Legionella* Phagosomes Intercept Vesicular Traffic from Endoplasmic Reticulum Exit Sites ». *Nature Cell Biology* 4 (12): 945- 54. <https://doi.org/10.1038/ncb883>.
- Kaspy, Ilana, Eitan Rotem, Noga Weiss, Irine Ronin, Nathalie Q. Balaban, et Gad Glaser. 2013. « HipA-Mediated Antibiotic Persistence via Phosphorylation of the Glutamyl-TRNA-Synthetase ». *Nature Communications* 4 (1): 1- 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms4001>.
- Kawano, Mitsuoki, L. Aravind, et Gisela Storz. 2007. « An Antisense RNA Controls Synthesis of an SOS-Induced Toxin Evolved from an Antitoxin ». *Molecular Microbiology* 64 (3): 738- 54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05688.x>.
- Kenney, Linda J. 2019. « The role of acid stress in *Salmonella* pathogenesis ». *Current Opinion in Microbiology, Host-microbe interactions: bacteria*, edited by Karen M. Ottemann & Linda J. Kenney, 47 (février): 45- 51. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.11.006>.
- Kim, Jisun, et Woojun Park. 2015. « Indole: A Signaling Molecule or a Mere Metabolic Byproduct That Alters Bacterial Physiology at a High Concentration? » *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 53 (7): 421- 28. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-5273-3>.
- Kinchen, Jason M., et Kodi S. Ravichandran. 2008. « Phagosome Maturation: Going through the Acid Test ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (10): 781- 95. <https://doi.org/10.1038/nrm2515>.
- Klausen, Mikkel, Arne Heydorn, Paula Ragas, Lotte Lambertsen, Anders Aaes-Jørgensen, Søren Molin, et Tim Tolker-Nielsen. 2003. « Biofilm Formation by *Pseudomonas Aeruginosa* Wild Type, Flagella and Type IV Pili Mutants ». *Molecular Microbiology* 48 (6): 1511- 24. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03525.x>.
- Koh, Eun-Ik, Anne E. Robinson, Nilantha Bandara, Buck E. Rogers, et Jeffrey P. Henderson. 2017. « Copper Import in *Escherichia Coli* by the Yersiniabactin Metallophore System ». *Nature Chemical Biology* 13 (9): 1016- 21. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2441>.
- Koh, Kai Shyang, Kin Wai Lam, Morten Alhede, Shu Yeong Queck, Maurizio Labbate, Staffan Kjelleberg, et Scott A. Rice. 2007. « Phenotypic Diversification and Adaptation of *Serratia Marcescens* MG1 Biofilm-Derived Morphotypes ». *Journal of Bacteriology* 189 (1): 119- 30. <https://doi.org/10.1128/JB.00930-06>.
- Kolenbrander, Paul E. 2000. « Oral Microbial Communities: Biofilms, Interactions, and Genetic Systems ». *Annual Review of Microbiology* 54 (1): 413- 37. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.413>.
- Kolenda, Rafal, Maciej Ugorski, et Krzysztof Grzymajlo. 2019. « Everything You Always Wanted to Know About *Salmonella* Type 1 Fimbriae, but Were Afraid to Ask ». *Frontiers in Microbiology* 10 (mai). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01017>.
- Korch, Shaleen B., Thomas A. Henderson, et Thomas M. Hill. 2003. « Characterization of the HipA7 Allele of *Escherichia Coli* and Evidence That High Persistence Is Governed by (p)PpGpp Synthesis ». *Molecular Microbiology* 50 (4): 1199- 1213. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03779.x>.
- Kussell, Edo, Roy Kishony, Nathalie Q. Balaban, et Stanislas Leibler. 2005. « Bacterial Persistence: A Model of Survival in Changing Environments ». *Genetics* 169 (4): 1807- 14. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.035352>.

- Kvist, Malin, Viktoria Hancock, et Per Klemm. 2008. « Inactivation of Efflux Pumps Abolishes Bacterial Biofilm Formation ». *Applied and Environmental Microbiology* 74 (23): 7376- 82. <https://doi.org/10.1128/AEM.01310-08>.
- Kwan, David H., et Stephen G. Withers. 2014. « Periplasmic de-acylase helps bacteria don their biofilm coat ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (30): 10904- 5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410789111>.
- Kyei, George B., Isabelle Vergne, Jennifer Chua, Esteban Roberts, James Harris, Jagath R. Junutula, et Vojo Deretic. 2006. « Rab14 Is Critical for Maintenance of Mycobacterium Tuberculosis Phagosome Maturation Arrest ». *The EMBO Journal* 25 (22): 5250- 59. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601407>.
- Lapaquette, Pierre, Marie-Agnès Bringer, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2012. « Defects in Autophagy Favour Adherent-Invasive Escherichia Coli Persistence within Macrophages Leading to Increased pro-Inflammatory Response ». *Cellular Microbiology* 14 (6): 791- 807. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01768.x>.
- Lapaquette, Pierre, Anne-Lise Glasser, Alan Huett, Ramnik J. Xavier, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2010. « Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly ». *Cellular microbiology* 12 (1): 99- 113. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01381.x>.
- Latifi, A., M. Foglino, K. Tanaka, P. Williams, et A. Lazdunski. 1996. « A Hierarchical Quorum-Sensing Cascade in Pseudomonas Aeruginosa Links the Transcriptional Activators LasR and RhIR (VsmR) to Expression of the Stationary-Phase Sigma Factor RpoS ». *Molecular Microbiology* 21 (6): 1137- 46. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.00063.x>.
- Lease, R. A., et M. Belfort. 2000. « A Trans-Acting RNA as a Control Switch in Escherichia Coli: DsrA Modulates Function by Forming Alternative Structures ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (18): 9919- 24. <https://doi.org/10.1073/pnas.170281497>.
- Lebeaux, David, Jean-Marc Ghigo, et Christophe Beloin. 2014. « Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 78 (3): 510- 43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14>.
- Leid, Jeff G., Carey J. Willson, Mark E. Shirtliff, Daniel J. Hassett, Matthew R. Parsek, et Alyssa K. Jeffers. 2005. « The Exopolysaccharide Alginate Protects Pseudomonas Aeruginosa Biofilm Bacteria from IFN-Gamma-Mediated Macrophage Killing ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (11): 7512- 18. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7512>.
- Lennon, Jay T., et Stuart E. Jones. 2011. « Microbial Seed Banks: The Ecological and Evolutionary Implications of Dormancy ». *Nature Reviews Microbiology* 9 (2): 119- 30. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2504>.
- Leriche, V., P. Sibille, et B. Carpentier. 2000. « Use of an Enzyme-Linked Lectinsorbent Assay To Monitor the Shift in Polysaccharide Composition in Bacterial Biofilms ». *Applied and Environmental Microbiology* 66 (5): 1851- 56.
- Leung, Vincent, et Céline M. Lévesque. 2012. « A Stress-Inducible Quorum-Sensing Peptide Mediates the Formation of Persister Cells with Noninherited Multidrug Tolerance ». *Journal of Bacteriology* 194 (9): 2265- 74. <https://doi.org/10.1128/JB.06707-11>.
- Levin, Bruce R., Jeniffer Concepción-Acevedo, et Klas I. Udekwi. 2014. « Persistence: A Copacetic and Parsimonious Hypothesis for the Existence of Non-Inherited Resistance to Antibiotics ». *Current Opinion in Microbiology* 21 (octobre): 18- 21. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.06.016>.
- Levin-Reisman, Irit, Irine Ronin, Orit Gefen, Ilan Braniss, Noam Shoshitaishvili, et Nathalie Q. Balaban. 2017. « Antibiotic Tolerance Facilitates the Evolution of Resistance ». *Science (New York, N.Y.)* 355 (6327): 826- 30. <https://doi.org/10.1126/science.aaj2191>.
- Levy, S. B. 1992. « Active Efflux Mechanisms for Antimicrobial Resistance. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36 (4): 695- 703. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.4.695>.
- Lewis, Kim. 2007. « Persister Cells, Dormancy and Infectious Disease ». *Nature Reviews Microbiology* 5 (1): 48- 56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1557>.
- . 2010. « Persister Cells ». *Annual Review of Microbiology* 64 (1): 357- 72. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>.
- Li, S. R., N. Dorrell, P. H. Everest, G. Dougan, et B. W. Wren. 1996. « Construction and Characterization of a Yersinia Enterocolitica O:8 High-Temperature Requirement (HtrA) Isogenic Mutant ». *Infection and Immunity* 64 (6): 2088- 94.
- Li, Yung-Hua, et Xiaolin Tian. 2012. « Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms ». *Sensors (Basel, Switzerland)* 12 (3): 2519- 38. <https://doi.org/10.3390/s120302519>.

- Liao, Julie, Michael J. Schurr, et Karin Sauer. 2013. « The MerR-like Regulator BrIR Confers Biofilm Tolerance by Activating Multidrug Efflux Pumps in *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms ». *Journal of Bacteriology* 195 (15): 3352- 63. <https://doi.org/10.1128/JB.00318-13>.
- Limoli, Dominique H., Christopher J. Jones, et Daniel J. Wozniak. 2015. « Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function ». *Microbiology spectrum* 3 (3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014>.
- Lin, Jinshui, Weipeng Zhang, Juanli Cheng, Xu Yang, Kaixiang Zhu, Yao Wang, Gehong Wei, Pei-Yuan Qian, Zhao-Qing Luo, et Xihui Shen. 2017. « A *Pseudomonas* T6SS Effector Recruits PQS-Containing Outer Membrane Vesicles for Iron Acquisition ». *Nature Communications* 8 (1): 1- 12. <https://doi.org/10.1038/ncomms14888>.
- Lipinska, B., O. Fayet, L. Baird, et C. Georgopoulos. 1989. « Identification, Characterization, and Mapping of the *Escherichia Coli* HtrA Gene, Whose Product Is Essential for Bacterial Growth Only at Elevated Temperatures ». *Journal of Bacteriology* 171 (3): 1574- 84. <https://doi.org/10.1128/jb.171.3.1574-1584.1989>.
- Liss, Viktoria, A. Leoni Swart, Alexander Kehl, Natascha Hermanns, Yuying Zhang, Deepak Chikkaballi, Nathalie Böhles, Jörg Deiwick, et Michael Hensel. 2017. « *Salmonella Enterica* Remodels the Host Cell Endosomal System for Efficient Intravacuolar Nutrition ». *Cell Host & Microbe* 21 (3): 390- 402. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.02.005>.
- Liu, Hongyan, Weichao Bao, Mingqun Lin, Hua Niu, et Yasuko Rikihisa. 2012. « Ehrlichia type IV secretion effector ECH0825 is translocated to mitochondria and curbs ROS and apoptosis by upregulating host MnSOD ». *Cellular Microbiology* 14 (7): 1037- 50. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01775.x>.
- Liu, Zhen, Hua Niu, Shuyan Wu, et Rui Huang. 2014. « CsgD Regulatory Network in a Bacterial Trait-Altering Biofilm Formation ». *Emerging Microbes & Infections* 3 (1): e1. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.1>.
- López, Daniel, Hera Vlamakis, Richard Losick, et Roberto Kolter. 2009a. « Cannibalism Enhances Biofilm Development in *Bacillus Subtilis* ». *Molecular Microbiology* 74 (3): 609- 18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06882.x>.
- . 2009b. « Cannibalism Enhances Biofilm Development in *Bacillus Subtilis* ». *Molecular Microbiology* 74 (3): 609- 18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06882.x>.
- Lührmann, Anja, Hayley J. Newton, et Matteo Bonazzi. 2017. « Beginning to Understand the Role of the Type IV Secretion System Effector Proteins in *Coxiella Burnetii* Pathogenesis ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 413: 243- 68. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75241-9_10.
- Lyczak, Jeffrey B., Carolyn L. Cannon, et Gerald B. Pier. 2002. « Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis ». *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2): 194- 222. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.194-222.2002>.
- Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, et J. E. Hearst. 1995. « Genes AcrA and AcrB Encode a Stress-Induced Efflux System of *Escherichia Coli* ». *Molecular Microbiology* 16 (1): 45- 55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02390.x>.
- Ma, Luyan, Juan Wang, Shiwei Wang, Erin M. Anderson, Joseph S. Lam, Matthew R. Parsek, et Daniel J. Wozniak. 2012. « Synthesis of Multiple *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Matrix Exopolysaccharides Is Post-Transcriptionally Regulated ». *Environmental Microbiology* 14 (8): 1995- 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02753.x>.
- Macomber, Lee, et James A. Imlay. 2009. « The Iron-Sulfur Clusters of Dehydratases Are Primary Intracellular Targets of Copper Toxicity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (20): 8344- 49. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812808106>.
- Mah, T. F., et G. A. O'Toole. 2001. « Mechanisms of Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents ». *Trends in Microbiology* 9 (1): 34- 39.
- Majdalani, Nadim, et Susan Gottesman. 2005. « The Rcs Phosphorelay: A Complex Signal Transduction System ». *Annual Review of Microbiology* 59: 379- 405. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.050405.101230>.
- Majdalani, Nadim, David Hernandez, et Susan Gottesman. 2002. « Regulation and Mode of Action of the Second Small RNA Activator of RpoS Translation, RprA ». *Molecular Microbiology* 46 (3): 813- 26. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03203.x>.
- Mandin, Pierre, et Susan Gottesman. 2010. « Integrating anaerobic/aerobic sensing and the general stress response through the ArcZ small RNA ». *The EMBO Journal* 29 (18): 3094- 3107. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.179>.
- Mann, Elizabeth A., et Shehzad A. Saeed. 2012. « Gastrointestinal Infection as a Trigger for Inflammatory Bowel Disease ». *Current Opinion in Gastroenterology* 28 (1): 24- 29. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32834c453e>.

- Marks, Daniel J. B. 2011. « Defective Innate Immunity in Inflammatory Bowel Disease: A Crohn's Disease Exclusivity? » *Current Opinion in Gastroenterology* 27 (4): 328- 34. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3283463b45>.
- Marques, Cláudia N. H., David G. Davies, et Karin Sauer. 2015. « Control of Biofilms with the Fatty Acid Signaling Molecule cis-2-Decenoic Acid ». *Pharmaceuticals* 8 (4): 816- 35. <https://doi.org/10.3390/ph8040816>.
- Martin, Helen M., Barry J. Campbell, C. Anthony Hart, Chiedzo Mpofu, Manu Nayar, Ravinder Singh, Hans Englyst, Helen F. Williams, et Jonathan M. Rhodes. 2004. « Enhanced Escherichia Coli Adherence and Invasion in Crohn's Disease and Colon Cancer 1 ». *Gastroenterology* 127 (1): 80- 93. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.03.054>.
- Martinez, Juan J., et Scott J. Hultgren. 2002. « Requirement of Rho-Family GTPases in the Invasion of Type 1-Piliated Uropathogenic Escherichia Coli ». *Cellular Microbiology* 4 (1): 19- 28. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00166.x>.
- Martinez-Medina, Margarita, Xavier Aldeguer, Mireia Lopez-Siles, Ferran González-Huix, Carles López-Oliu, Ghizlane Dahbi, Jesus E. Blanco, Jorge Blanco, L. Jesus Garcia-Gil, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2009. « Molecular Diversity of Escherichia Coli in the Human Gut: New Ecological Evidence Supporting the Role of Adherent-Invasive E. Coli (AIEC) in Crohn's Disease ». *Inflammatory Bowel Diseases* 15 (6): 872- 82. <https://doi.org/10.1002/ibd.20860>.
- Martinez-Medina, Margarita, Azucena Mora, Miguel Blanco, Cecilia López, María Pilar Alonso, Stéphane Bonacorsi, Marie-Hélène Nicolas-Chanoine, Arlette Darfeuille-Michaud, Jesus Garcia-Gil, et Jorge Blanco. 2009. « Similarity and Divergence among Adherent-Invasive Escherichia coli and Extraintestinal Pathogenic E. coli Strains ». *Journal of Clinical Microbiology* 47 (12): 3968- 79. <https://doi.org/10.1128/JCM.01484-09>.
- Martinez-Medina, Margarita, Plínio Naves, Jorge Blanco, Xavier Aldeguer, Jesus E Blanco, Miguel Blanco, Carmen Ponte, Francisco Soriano, Arlette Darfeuille-Michaud, et L Jesus Garcia-Gil. 2009. « Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive Escherichia coli (AIEC) ». *BMC Microbiology* 9 (septembre): 202. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-202>.
- Martino, P. Di, R. Fursy, L. Bret, B. Sundararaju, et R. S. Phillips. 2003. « Indole Can Act as an Extracellular Signal to Regulate Biofilm Formation of Escherichia Coli and Other Indole-Producing Bacteria ». *Canadian Journal of Microbiology* 49 (7): 443- 49. <https://doi.org/10.1139/w03-056>.
- Massé, Eric, Hubert Salvail, Guillaume Desnoyers, et Mélina Arguin. 2007. « Small RNAs Controlling Iron Metabolism ». *Current Opinion in Microbiology* 10 (2): 140- 45. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.03.013>.
- McBroom, Amanda J., et Meta J. Kuehn. 2007. « Release of Outer Membrane Vesicles by Gram-Negative Bacteria Is a Novel Envelope Stress Response ». *Molecular Microbiology* 63 (2): 545- 58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x>.
- McEllistrem, M. Catherine, Jennifer V. Ransford, et Saleem A. Khan. 2007. « Characterization of in Vitro Biofilm-Associated Pneumococcal Phase Variants of a Clinically Relevant Serotype 3 Clone ». *Journal of Clinical Microbiology* 45 (1): 97- 101. <https://doi.org/10.1128/JCM.01658-06>.
- McHugh, Jonathan P., Francisco Rodríguez-Quinoñes, Hossein Abdul-Tehrani, Dimitri A. Svistunenko, Robert K. Poole, Chris E. Cooper, et Simon C. Andrews. 2003. « Global Iron-Dependent Gene Regulation in Escherichia Coli. A New Mechanism for Iron Homeostasis ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (32): 29478- 86. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303381200>.
- McKenney, D., J. Hübner, E. Muller, Y. Wang, D. A. Goldmann, et G. B. Pier. 1998. « The Ica Locus of Staphylococcus Epidermidis Encodes Production of the Capsular Polysaccharide/Adhesin ». *Infection and Immunity* 66 (10): 4711- 20.
- McNeill, Karol, et I. R. Hamilton. 2003. « Acid tolerance response of biofilm cells of Streptococcus mutans ». *FEMS Microbiology Letters* 221 (1): 25- 30. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00164-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00164-2).
- Medzhitov, Ruslan. 2007. « Recognition of Microorganisms and Activation of the Immune Response ». *Nature* 449 (7164): 819- 26. <https://doi.org/10.1038/nature06246>.
- Miao, Edward A., Irina A. Leaf, Piper M. Treuting, Dat P. Mao, Monica Dors, Anasuya Sarkar, Sarah E. Warren, Mark D. Wewers, et Alan Aderem. 2010. « Caspase-1-Induced Pyroptosis Is an Innate Immune Effector Mechanism against Intracellular Bacteria ». *Nature Immunology* 11 (12): 1136- 42. <https://doi.org/10.1038/ni.1960>.
- Michiels, T., P. Wattiau, R. Brasseur, J. M. Ruysschaert, et G. Cornelis. 1990. « Secretion of Yop Proteins by Yersiniae ». *Infection and Immunity* 58 (9): 2840- 49.

- Miethke, Marcus, et Mohamed A. Marahiel. 2007. « Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 71 (3): 413- 51. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>.
- Mika, Franziska, et Regine Hengge. 2013. « Small Regulatory RNAs in the Control of Motility and Biofilm Formation in *E. Coli* and *Salmonella* ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (3): 4560- 79. <https://doi.org/10.3390/ijms14034560>.
- . 2014. « Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of *Escherichia coli* ». *RNA Biology* 11 (5): 494- 507. <https://doi.org/10.4161/rna.28867>.
- Miki, Tsuyoshi, Nobuhiko Okada, Yeongsuk Kim, Akio Abe, et Hirofumi Danbara. 2008. « DsbA Directs Efficient Expression of Outer Membrane Secretin EscC of the Enteropathogenic *Escherichia Coli* Type III Secretion Apparatus ». *Microbial Pathogenesis* 44 (2): 151- 58. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.09.001>.
- Miquel, Sylvie, Laurent Claret, Richard Bonnet, Imen Dorboz, Nicolas Barnich, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2010. « Role of Decreased Levels of Fis Histone-like Protein in Crohn's Disease-Associated Adherent Invasive *Escherichia Coli* LF82 Bacteria Interacting with Intestinal Epithelial Cells ». *Journal of Bacteriology* 192 (7): 1832- 43. <https://doi.org/10.1128/JB.01679-09>.
- Miquel, Sylvie, Eric Peyretailade, Laurent Claret, Amélie de Vallée, Carole Dossat, Benoit Vacherie, El Hajji Zineb, et al. 2010a. « Complete Genome Sequence of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *E. coli* Strain LF82 ». *PLoS ONE* 5 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012714>.
- . 2010b. « Complete Genome Sequence of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *E. Coli* Strain LF82 ». *PLoS One* 5 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012714>.
- Mitchell, Gabriel, Chen Chen, et Daniel A. Portnoy. 2016. « Strategies used by bacteria to grow in macrophages ». *Microbiology spectrum* 4 (3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0012-2015>.
- Möker, Nina, Charles R. Dean, et Jianshi Tao. 2010. « *Pseudomonas Aeruginosa* Increases Formation of Multidrug-Tolerant Persister Cells in Response to Quorum-Sensing Signaling Molecules ». *Journal of Bacteriology* 192 (7): 1946- 55. <https://doi.org/10.1128/JB.01231-09>.
- Molmeret, Maëlle, Matthias Horn, Michael Wagner, Marina Santic, et Yousef Abu Kwaik. 2005. « Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens ». *Applied and Environmental Microbiology* 71 (1): 20- 28. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.20-28.2005>.
- Moscoso, Joana A., Helga Mikkelsen, Stephan Heeb, Paul Williams, et Alain Filloux. 2011. « The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches Type III and Type VI secretion via c-di-GMP signalling ». *Environmental Microbiology* 13 (12): 3128- 38. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02595.x>.
- Moser, C., S. Kjaergaard, T. Pressler, A. Kharazmi, C. Koch, et N. Høiby. 2000. « The Immune Response to Chronic *Pseudomonas Aeruginosa* Lung Infection in Cystic Fibrosis Patients Is Predominantly of the Th2 Type ». *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 108 (5): 329- 35. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2000.d01-64.x>.
- Motta, Jean-Paul, Thibault Allain, Luke E Green-Harrison, Ryan A Groves, Troy Feener, Hena Ramay, Paul L Beck, Ian A Lewis, John L Wallace, et Andre G Buret. 2018. « Iron Sequestration in Microbiota Biofilms As A Novel Strategy for Treating Inflammatory Bowel Disease ». *Inflammatory Bowel Diseases* 24 (7): 1493- 1502. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy116>.
- Mouton, Jacoba M., Sophie Helaine, David W. Holden, et Samantha L. Sampson. 2016. « Elucidating population-wide mycobacterial replication dynamics at the single-cell level ». *Microbiology* 162 (6): 966- 78. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000288>.
- Mrakovic, Amra, Jason G. Kay, Wendy Furuya, John H. Brumell, et Roberto J. Botelho. 2012. « Rab7 and Arl8 GTPases are Necessary for Lysosome Tubulation in Macrophages ». *Traffic* 13 (12): 1667- 79. <https://doi.org/10.1111/tra.12003>.
- Mulvey, Matthew A. 2002. « Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli* ». *Cellular Microbiology* 4 (5): 257- 71. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00193.x>.
- Mulvey, Matthew A., Joel D. Schilling, et Scott J. Hultgren. 2001. « Establishment of a Persistent *Escherichia Coli* Reservoir during the Acute Phase of a Bladder Infection ». *Infection and Immunity* 69 (7): 4572- 79. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4572-4579.2001>.
- Murashko, Oleg N., et Sue Lin-Chao. 2017. « *Escherichia coli* responds to environmental changes using enolase degradosomes and stabilized DicF sRNA to alter cellular morphology ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (38): E8025- 34. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703731114>.

- Mysorekar, Indira U., et Scott J. Hultgren. 2006. « Mechanisms of Uropathogenic Escherichia Coli Persistence and Eradication from the Urinary Tract ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (38): 14170- 75. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602136103>.
- Nagao-Kitamoto, Hiroko, Sho Kitamoto, Peter Kuffa, et Nobuhiko Kamada. 2016. « Pathogenic Role of the Gut Microbiota in Gastrointestinal Diseases ». *Intestinal Research* 14 (2): 127- 38. <https://doi.org/10.5217/ir.2016.14.2.127>.
- Nairz, Manfred, David Haschka, Egon Demetz, et Günter Weiss. 2014. « Iron at the interface of immunity and infection ». *Frontiers in Pharmacology* 5 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00152>.
- Nash, John HE, Andre Villegas, Andrew M Kropinski, Renan Aguilar-Valenzuela, Paulina Konczyk, Mariola Mascarenhas, Kim Ziebell, Alfredo G Torres, Mohamed A Karmali, et Brian K Coombes. 2010. « Genome sequence of adherent-invasive Escherichia coli and comparative genomic analysis with other E. coli pathotypes ». *BMC Genomics* 11 (novembre): 667. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-667>.
- Nash, John He, Andre Villegas, Andrew M. Kropinski, Renan Aguilar-Valenzuela, Paulina Konczyk, Mariola Mascarenhas, Kim Ziebell, Alfredo G. Torres, Mohamed A. Karmali, et Brian K. Coombes. 2010. « Genome Sequence of Adherent-Invasive Escherichia Coli and Comparative Genomic Analysis with Other E. Coli Pathotypes ». *BMC Genomics* 11 (novembre): 667. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-667>.
- Negróni, Anna, Maria Pierdomenico, Salvatore Cucchiara, et Laura Stronati. 2018. « NOD2 and inflammation: current insights ». *Journal of Inflammation Research* 11 (février): 49- 60. <https://doi.org/10.2147/JIR.S137606>.
- Nguyen, Dao, et Pradeep K. Singh. 2006. « Evolving Stealth: Genetic Adaptation of Pseudomonas Aeruginosa during Cystic Fibrosis Infections ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (22): 8305 - 6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602526103>.
- Nguyen, Hang Thi Thu, Guillaume Dalmasso, Stefan Müller, Jessica Carrière, Frank Seibold, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2014. « Crohn's Disease-Associated Adherent Invasive Escherichia Coli Modulate Levels of MicroRNAs in Intestinal Epithelial Cells to Reduce Autophagy ». *Gastroenterology* 146 (2): 508- 19. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.021>.
- Noto, Jennifer M., et Richard M. Peek. 2011. « The Role of MicroRNAs in Helicobacter Pylori Pathogenesis and Gastric Carcinogenesis ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 1: 21. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2011.00021>.
- O'Brien, Claire L., Marie-Agnès Bringer, Kathryn E. Holt, David M. Gordon, Anaëlle L. Dubois, Nicolas Barnich, Arlette Darfeuille-Michaud, et Paul Pavli. 2017. « Comparative Genomics of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia Coli ». *Gut* 66 (8): 1382 - 89. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-311059>.
- Ogasawara, Hiroshi, Kaneyoshi Yamamoto, et Akira Ishihama. 2011. « Role of the Biofilm Master Regulator CsgD in Cross-Regulation between Biofilm Formation and Flagellar Synthesis ». *Journal of Bacteriology* 193 (10): 2587 - 97. <https://doi.org/10.1128/JB.01468-10>.
- Ogura, Yasunori, Naohiro Inohara, Adalberto Benito, Felicia F. Chen, Shoji Yamaoka, et Gabriel Núñez. 2001. « Nod2, a Nod1/Apaf-1 Family Member That Is Restricted to Monocytes and Activates NF-KB ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (7): 4812 - 18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008072200>.
- Olsén, A., A. Arnqvist, M. Hammar, S. Sukupolvi, et S. Normark. 1993. « The RpoS Sigma Factor Relieves H-NS-Mediated Transcriptional Repression of CsgA, the Subunit Gene of Fibronectin-Binding Curli in Escherichia Coli ». *Molecular Microbiology* 7 (4): 523 - 36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01143.x>.
- Orman, Mehmet A., et Mark P. Brynildsen. 2013. « Dormancy Is Not Necessary or Sufficient for Bacterial Persistence ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (7): 3230- 39. <https://doi.org/10.1128/AAC.00243-13>.
- Otto, M. 2006. « Bacterial Evasion of Antimicrobial Peptides by Biofilm Formation ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 306: 251 - 58. https://doi.org/10.1007/3-540-29916-5_10.
- Paauw, Armand, Maurine A. Leverstein-van Hall, Kok P. M. van Kessel, Jan Verhoef, et Ad C. Fluit. 2009. « Yersiniabactin Reduces the Respiratory Oxidative Stress Response of Innate Immune Cells ». *PLoS One* 4 (12): e8240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008240>.
- Pace, Fernanda de, Jacqueline Boldrin de Paiva, Gerson Nakazato, Marcelo Lancellotti, Marcelo Palma Sircili, Eliana Guedes Stehling, Wanderley Dias da Silveira, et Vanessa Sperandio. 2011. « Characterization of IcmF of the type VI secretion system in an avian pathogenic Escherichia coli (APEC) strain ». *Microbiology* 157 (Pt 10): 2954 - 62. <https://doi.org/10.1099/mic.0.050005-0>.

- Palmer, Kelli L., Lindsay M. Aye, et Marvin Whiteley. 2007. « Nutritional Cues Control *Pseudomonas Aeruginosa* Multicellular Behavior in Cystic Fibrosis Sputum ». *Journal of Bacteriology* 189 (22): 8079- 87. <https://doi.org/10.1128/JB.01138-07>.
- Park, Sungsu, Peter M. Wolanin, Emil A. Yuzbashyan, Pascal Silberzan, Jeffrey B. Stock, et Robert H. Austin. 2003. « Motion to Form a Quorum ». *Science* 301 (5630): 188- 188. <https://doi.org/10.1126/science.1079805>.
- Park, Young-Jun, Kaitlyn D. Lacourse, Christian Cambillau, Frank DiMaio, Joseph D. Mougous, et David Veesler. 2018. « Structure of the Type VI Secretion System TssK–TssF–TssG Baseplate Subcomplex Revealed by Cryo-Electron Microscopy ». *Nature Communications* 9 (1): 1- 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07796-5>.
- Parkhill, J., G. Dougan, K. D. James, N. R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, et al. 2001. « Complete Genome Sequence of a Multiple Drug Resistant *Salmonella Enterica* Serovar Typhi CT18 ». *Nature* 413 (6858): 848- 52. <https://doi.org/10.1038/35101607>.
- Parsek, Matthew R., et Pradeep K. Singh. 2003. « Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis ». *Annual Review of Microbiology* 57: 677- 701. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090720>.
- Pedersen, L. L., M. Radulic, M. Doric, et Y. Abu Kwaik. 2001. « HtrA Homologue of *Legionella Pneumophila*: An Indispensable Element for Intracellular Infection of Mammalian but Not Protozoan Cells ». *Infection and Immunity* 69 (4): 2569- 79. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2569-2579.2001>.
- Petnicki-Ocwieja, Tanja, Tomas Hrcir, Yuen-Joyce Liu, Amlan Biswas, Tomas Hudcovic, Helena Tlaskalova-Hogenova, et Koichi S. Kobayashi. 2009. « Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (37): 15813- 18. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907722106>.
- Price, Jordan V., et Russell E. Vance. 2014. « The Macrophage Paradox ». *Immunity* 41 (5): 685- 93. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.015>.
- Prigent-Combaret, C., G. Prensier, T. T. Le Thi, O. Vidal, P. Lejeune, et C. Dorel. 2000. « Developmental Pathway for Biofilm Formation in Curli-Producing *Escherichia Coli* Strains: Role of Flagella, Curli and Colanic Acid ». *Environmental Microbiology* 2 (4): 450- 64.
- Pukatzki, Stefan, Amy T. Ma, Andrew T. Revel, Derek Sturtevant, et John J. Mekalanos. 2007. « Type VI Secretion System Translocates a Phage Tail Spike-like Protein into Target Cells Where It Cross-Links Actin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (39): 15508- 13. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706532104>.
- Purcell, M., et H. A. Shuman. 1998. « The *Legionella Pneumophila* IcmGCDJBF Genes Are Required for Killing of Human Macrophages ». *Infection and Immunity* 66 (5): 2245- 55.
- Purdy, Georgiana E., Mei Hong, et Shelley M. Payne. 2002. « *Shigella Flexneri* DegP Facilitates IcsA Surface Expression and Is Required for Efficient Intercellular Spread ». *Infection and Immunity* 70 (11): 6355- 64. <https://doi.org/10.1128/iai.70.11.6355-6364.2002>.
- Qin, Junjie, Ruiqiang Li, Jeroen Raes, Manimozhiyan Arumugam, Kristoffer Solvsten Burgdorf, Chaysavanh Manichanh, Trine Nielsen, et al. 2010. « A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing ». *Nature* 464 (7285): 59- 65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>.
- Quiros, Miguel, Hikaru Nishio, Philipp A. Neumann, Dorothee Siuda, Jennifer C. Brazil, Veronica Azcutia, Roland Hilgarth, et al. s. d. « Macrophage-derived IL-10 mediates mucosal repair by epithelial WISP-1 signaling ». *The Journal of Clinical Investigation* 127 (9): 3510- 20. <https://doi.org/10.1172/JCI90229>.
- Rahighi, Simin, Fumiyo Ikeda, Masato Kawasaki, Masato Akutsu, Nobuhiro Suzuki, Ryuichi Kato, Tobias Kensche, et al. 2009. « Specific Recognition of Linear Ubiquitin Chains by NEMO Is Important for NF-KB Activation ». *Cell* 136 (6): 1098- 1109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.007>.
- Rajaram, Murugesan V. S., Michelle N. Brooks, Jessica D. Morris, Jordi B. Torrelles, Abul K. Azad, et Larry S. Schlesinger. 2010. « *Mycobacterium Tuberculosis* Activates Human Macrophage Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Linking Mannose Receptor Recognition to Regulation of Immune Responses ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (2): 929- 42. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000866>.
- Rajilić-Stojanović, Mirjana, Hans G. H. J. Heilig, Sebastian Tims, Erwin G. Zoetendal, et Willem M. de Vos. 2012. « Long-Term Monitoring of the Human Intestinal Microbiota Composition ». *Environmental Microbiology*, octobre. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12023>.
- Rao, P. S. Srinivasa, Yoshiyuki Yamada, Yuen Peng Tan, et Ka Yin Leung. 2004. « Use of Proteomics to Identify Novel Virulence Determinants That Are Required for *Edwardsiella Tarda* Pathogenesis ». *Molecular Microbiology* 53 (2): 573- 86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04123.x>.

- Rapisarda, Chiara, et Rémi Fronzes. 2018. « Secretion Systems Used by Bacteria to Subvert Host Functions ». *Current Issues in Molecular Biology* 25: 1- 42. <https://doi.org/10.21775/cimb.025.001>.
- Reigstad, Christopher S., Scott J. Hultgren, et Jeffrey I. Gordon. 2007. « Functional Genomic Studies of Uropathogenic Escherichia Coli and Host Urothelial Cells When Intracellular Bacterial Communities Are Assembled ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (29): 21259- 67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611502200>.
- Reinoso Webb, Cynthia, Iurii Koboziev, Kathryn L. Furr, et Matthew B. Grisham. 2016. « Protective and Pro-Inflammatory Roles of Intestinal Bacteria ». *Pathophysiology: The Official Journal of the International Society for Pathophysiology* 23 (2): 67- 80. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2016.02.002>.
- Rhen, Mikael, Sofia Eriksson, Mark Clements, Sven Bergström, et Staffan J. Normark. 2003. « The Basis of Persistent Bacterial Infections ». *Trends in Microbiology* 11 (2): 80- 86. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(02\)00038-0](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(02)00038-0).
- Richards, Vincent P., Tristan Lefébure, Paulina D. Pavinski Bitar, Belgin Dogan, Kenneth W. Simpson, Ynte H. Schukken, et Michael J. Stanhope. 2015. « Genome Based Phylogeny and Comparative Genomic Analysis of Intra-Mammary Pathogenic Escherichia Coli ». *PLOS ONE* 10 (3): e0119799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119799>.
- Rivas, Manuel A., Melissa Beaudoin, Agnes Gardet, Christine Stevens, Yashoda Sharma, Clarence K. Zhang, Gabrielle Boucher, et al. 2011. « Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease ». *Nature genetics* 43 (11): 1066- 73. <https://doi.org/10.1038/ng.952>.
- Robinson, Anne E., Jessica E. Lowe, Eun-Ik Koh, et Jeffrey P. Henderson. 2018. « Uropathogenic Enterobacteria Use the Yersiniabactin Metallophore System to Acquire Nickel ». *The Journal of Biological Chemistry* 293 (39): 14953- 61. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004483>.
- Rolhion, Nathalie, Nicolas Barnich, Laurent Claret, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2005. « Strong Decrease in Invasive Ability and Outer Membrane Vesicle Release in Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia Coli Strain LF82 with the YfgL Gene Deleted ». *Journal of Bacteriology* 187 (7): 2286- 96. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2286-2296.2005>.
- Rolhion, Nathalie, Frédéric Antonio Carvalho, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2007. « OmpC and the ΣE Regulatory Pathway Are Involved in Adhesion and Invasion of the Crohn's Disease-Associated Escherichia Coli Strain LF82 ». *Molecular Microbiology* 63 (6): 1684- 1700. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05638.x>.
- Rolhion, Nathalie, Paul Hofman, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2011. « The endoplasmic reticulum stress response chaperone Gp96, a host receptor for Crohn disease-associated adherent-invasive Escherichia coli ». *Gut Microbes* 2 (2): 115- 19. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.2.15725>.
- Römling, Ute, Michael Y. Galperin, et Mark Gomelsky. 2013. « Cyclic Di-GMP: The First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 77 (1): 1- 52. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00043-12>.
- Römling, Ute, Mark Gomelsky, et Michael Y. Galperin. 2005. « C-Di-GMP: The Dawning of a Novel Bacterial Signalling System ». *Molecular Microbiology* 57 (3): 629- 39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04697.x>.
- Ronneau, Séverin, et Sophie Helaine. 2019. « Clarifying the Link between Toxin–Antitoxin Modules and Bacterial Persistence ». *Journal of Molecular Biology*, The molecular basis of antibiotic action and resistance, 431 (18): 3462- 71. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.03.019>.
- Rosales, Carlos, et Eileen Uribe-Querol. 2017. « Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity ». *BioMed Research International* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9042851>.
- Rosen, David A., Thomas M. Hooton, Walter E. Stamm, Peter A. Humphrey, et Scott J. Hultgren. 2007. « Detection of Intracellular Bacterial Communities in Human Urinary Tract Infection ». *Plos Medicine* 4 (12): 1949- 58. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040329>.
- Rosenstiel, Philip, Massimo Fantini, Karen Bräutigam, Tanja Kühbacher, Georg H. Waetzig, Dirk Seegert, et Stefan Schreiber. 2003. « TNF-Alpha and IFN-Gamma Regulate the Expression of the NOD2 (CARD15) Gene in Human Intestinal Epithelial Cells ». *Gastroenterology* 124 (4): 1001- 9. <https://doi.org/10.1053/gast.2003.50157>.
- Ross, J. I., E. A. Eady, J. H. Cove, W. J. Cunliffe, S. Baumberg, et J. C. Wootton. 1990. « Inducible Erythromycin Resistance in Staphylococci Is Encoded by a Member of the ATP-Binding Transport Super-Gene Family ». *Molecular Microbiology* 4 (7): 1207- 14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00696.x>.

- Rotem, Eitan, Adiel Loinger, Irine Ronin, Irit Levin-Reisman, Chana Gabay, Noam Shores, Ofer Biham, et Nathalie Q. Balaban. 2010. « Regulation of Phenotypic Variability by a Threshold-Based Mechanism Underlies Bacterial Persistence ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (28): 12541- 46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004333107>.
- Rugtveit, J, P Brandtzaeg, T S Halstensen, O Fausa, et H Scott. 1994. « Increased macrophage subset in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes. » *Gut* 35 (5): 669- 74.
- Ryan, P, M W Bennett, S Aarons, G Lee, J K Collins, G C O'Sullivan, J O'Connell, et F Shanahan. 2002. « PCR detection of Mycobacterium paratuberculosis in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection ». *Gut* 51 (5): 665- 70.
- Saha, Ratul, Nabaneeta Saha, Robert S. Donofrio, et Lorelle L. Bestervelt. 2013. « Microbial siderophores: a mini review ». *Journal of Basic Microbiology* 53 (4): 303- 17. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100552>.
- Salcedo, Suzana P., et David W. Holden. 2003. « SseG, a virulence protein that targets Salmonella to the Golgi network ». *The EMBO Journal* 22 (19): 5003- 14. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg517>.
- Sandoz, Kelsi M., Paul A. Beare, Diane C. Cockrell, et Robert A. Heinzen. 2016. « Complementation of Arginine Auxotrophy for Genetic Transformation of Coxiella Burnetii by Use of a Defined Axenic Medium ». *Applied and Environmental Microbiology* 82 (10): 3042- 51. <https://doi.org/10.1128/AEM.00261-16>.
- Saqib, Uzma, Sutripta Sarkar, Kyoungso Suk, Owais Mohammad, Mirza S. Baig, et Rajkumar Savai. 2018. « Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation ». *Oncotarget* 9 (25): 17937- 50. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24788>.
- Saric, Amra, Victoria E. B. Hipolito, Jason G. Kay, Johnathan Canton, Costin N. Antonescu, et Roberto J. Botelho. 2016. « mTOR controls lysosome tubulation and antigen presentation in macrophages and dendritic cells ». *Molecular Biology of the Cell* 27 (2): 321- 33. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-05-0272>.
- Sasaki, Maiko, Shanti V. Sitaraman, Brian A. Babbin, Peter Gerner-Smidt, Efrain M. Ribot, Nancy Garrett, Joel A. Alpern, et al. 2007. « Invasive Escherichia Coli Are a Feature of Crohn's Disease ». *Laboratory Investigation* 87 (10): 1042- 54. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700661>.
- Schilling, Joel D., Matthew A. Mulvey, et Scott J. Hultgren. 2001. « Structure and Function of Escherichia coli Type 1 Pili: New Insight into the Pathogenesis of Urinary Tract Infections ». *The Journal of Infectious Diseases* 183 (Supplement_1): S36- 40. <https://doi.org/10.1086/318855>.
- Schmidt, Thomas S. B., Jeroen Raes, et Peer Bork. 2018. « The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation ». *Cell* 172 (6): 1198- 1215. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.044>.
- Schoemaker, J. M., R. C. Gayda, et A. Markovitz. 1984. « Regulation of Cell Division in Escherichia Coli: SOS Induction and Cellular Location of the Sula Protein, a Key to Lon-Associated Filamentation and Death ». *Journal of Bacteriology* 158 (2): 551- 61.
- Schroeder, Gunnar N., et Hubert Hilbi. 2008. « Molecular Pathogenesis of Shigella Spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion ». *Clinical Microbiology Reviews* 21 (1): 134- 56. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-07>.
- Schultsz, C, M Moussa, R van Ketel, G N Tytgat, et J Dankert. 1997. « Frequency of pathogenic and enteroadherent Escherichia coli in patients with inflammatory bowel disease and controls. » *Journal of Clinical Pathology* 50 (7): 573- 79.
- Schumacher, Maria A., Pooja Balani, Jungki Min, Naga Babu Chinnam, Sonja Hansen, Marin Vulić, Kim Lewis, et Richard G. Brennan. 2015. « HipBA-Promoter Structures Reveal the Basis of Heritable Multidrug Tolerance ». *Nature* 524 (7563): 59- 64. <https://doi.org/10.1038/nature14662>.
- Schwechheimer, Carmen, et Meta J. Kuehn. 2015. « Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions ». *Nature reviews. Microbiology* 13 (10): 605- 19. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3525>.
- Scott, Victoria C. S., David A. Haake, Bernard M. Churchill, Sheryl S. Justice, et Ja-Hong Kim. 2015. « Intracellular Bacterial Communities: A Potential Etiology for Chronic Lower Urinary Tract Symptoms ». *Urology* 86 (3): 425- 31. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2015.04.002>.
- Sebastián Domingo, Juan José, et Clara Sánchez Sánchez. 2018. « From the Intestinal Flora to the Microbiome ». *Revista Espanola De Enfermedades Digestivas: Organo Oficial De La Sociedad Espanola De Patologia Digestiva* 110 (1): 51- 56. <https://doi.org/10.17235/reed.2017.4947/2017>.
- Seo, Sang Woo, Donghyuk Kim, Haythem Latif, Edward J. O'Brien, Richard Szubin, et Bernhard O. Palsson. 2014. « Deciphering Fur Transcriptional Regulatory Network Highlights Its Complex Role beyond Iron Metabolism in Escherichia Coli ». *Nature Communications* 5 (septembre): 4910. <https://doi.org/10.1038/ncomms5910>.

- Serra, Diego O., Anja M. Richter, et Regine Hengge. 2013. « Cellulose as an Architectural Element in Spatially Structured *Escherichia Coli* Biofilms ». *Journal of Bacteriology* 195 (24): 5540- 54. <https://doi.org/10.1128/JB.00946-13>.
- Serra, Diego O., Anja M. Richter, Gisela Klauack, Franziska Mika, et Regine Hengge. 2013. « Microanatomy at Cellular Resolution and Spatial Order of Physiological Differentiation in a Bacterial Biofilm ». *mBio* 4 (2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00103-13>.
- Seviour, Thomas, Nicolas Derlon, Morten Simonsen Dueholm, Hans-Curt Flemming, Elisabeth Girbal-Neuhauser, Harald Horn, Staffan Kjelleberg, et al. 2019. « Extracellular polymeric substances of biofilms: Suffering from an identity crisis ». *Water Research* 151 (mars): 1- 7. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.020>.
- Shaler, Christopher R., Wael Elhenawy, et Brian K. Coombes. 2019. « The Unique Lifestyle of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia Coli* ». *Journal of Molecular Biology* 431 (16): 2970- 81. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.023>.
- Shan, Yue, Autumn Brown Gandt, Sarah E. Rowe, Julia P. Deisinger, Brian P. Conlon, et Kim Lewis. 2017. « ATP-Dependent Persister Formation in *Escherichia Coli* ». *MBio* 8 (1): e02267-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.02267-16>.
- Sharahi, Javad Yasbolaghi, Taher Azimi, Aref Shariati, Hossein Safari, Melika Khanzadeh Tehrani, et Ali Hashemi. 2019. « Advanced Strategies for Combating Bacterial Biofilms ». *Journal of Cellular Physiology* 234 (9): 14689- 708. <https://doi.org/10.1002/jcp.28225>.
- Shirey, Kari Ann, Leah E. Cole, Achsa D. Keegan, et Stefanie N. Vogel. 2008. « *Francisella Tularensis* Live Vaccine Strain Induces Macrophage Alternative Activation as a Survival Mechanism ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (6): 4159- 67. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.4159>.
- Sidiq, Tabasum, Sayuri Yoshihama, Isaac Downs, et Koichi S. Kobayashi. 2016. « Nod2: A Critical Regulator of Ileal Microbiota and Crohn's Disease ». *Frontiers in Immunology* 7 (septembre). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00367>.
- Silhavy, Thomas J., Daniel Kahne, et Suzanne Walker. 2010. « The Bacterial Cell Envelope ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (5): a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>.
- Simm, Roger, Michael Morr, Abdul Kader, Manfred Nimtz, et Ute Römling. 2004. « GGDEF and EAL Domains Inversely Regulate Cyclic Di-GMP Levels and Transition from Sessility to Motility ». *Molecular Microbiology* 53 (4): 1123- 34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04206.x>.
- Singh, Pradeep K., Matthew R. Parsek, E. Peter Greenberg, et Michael J. Welsh. 2002. « A Component of Innate Immunity Prevents Bacterial Biofilm Development ». *Nature* 417 (6888): 552- 55. <https://doi.org/10.1038/417552a>.
- Singletary, Larissa A., Janet L. Gibson, Elizabeth J. Tanner, Gregory J. McKenzie, Peter L. Lee, Caleb Gonzalez, et Susan M. Rosenberg. 2009. « An SOS-Regulated Type 2 Toxin-Antitoxin System ». *Journal of Bacteriology* 191 (24): 7456- 65. <https://doi.org/10.1128/JB.00963-09>.
- Skaar, Eric P. 2010. « The Battle for Iron between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts ». *PLoS Pathogens* 6 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000949>.
- Skerrett, S. J., et T. R. Martin. 1996. « Roles for Tumor Necrosis Factor Alpha and Nitric Oxide in Resistance of Rat Alveolar Macrophages to *Legionella Pneumophila* ». *Infection and Immunity* 64 (8): 3236- 43.
- Smythies, Lesley E., Marty Sellers, Ronald H. Clements, Meg Mosteller-Barnum, Gang Meng, William H. Benjamin, Jan M. Orenstein, et Phillip D. Smith. 2005. « Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity ». *Journal of Clinical Investigation* 115 (1): 66- 75. <https://doi.org/10.1172/JCI200519229>.
- Snyder, Jennifer A., Brian J. Haugen, Eric L. Buckles, C. Virginia Lockatell, David E. Johnson, Michael S. Sonnenberg, Rodney A. Welch, et Harry L. T. Mobley. 2004. « Transcriptome of Uropathogenic *Escherichia coli* during Urinary Tract Infection ». *Infection and Immunity* 72 (11): 6373- 81. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.11.6373-6381.2004>.
- Southey-Pillig, Christopher J., David G. Davies, et Karin Sauer. 2005. « Characterization of Temporal Protein Production in *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms ». *Journal of Bacteriology* 187 (23): 8114- 26. <https://doi.org/10.1128/JB.187.23.8114-8126.2005>.
- Srivatsan, Anjana, et Jue D. Wang. 2008. « Control of Bacterial Transcription, Translation and Replication by (p)PpGpp ». *Current Opinion in Microbiology* 11 (2): 100- 105. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.001>.
- Stapels, Daphne A. C., Peter W. S. Hill, Alexander J. Westermann, Robert A. Fisher, Teresa L. Thurston, Antoine-Emmanuel Saliba, Isabelle Blommestein, Jörg Vogel, et Sophie Helaine. 2018. « *Salmonella* Persists

- Undermine Host Immune Defenses during Antibiotic Treatment ». *Science (New York, N.Y.)* 362 (6419): 1156- 60. <https://doi.org/10.1126/science.aat7148>.
- Stevenson, Taylor C., Colette Cywes-Bentley, Tyler D. Moeller, Kevin B. Weyant, David Putnam, Yung-Fu Chang, Bradley D. Jones, Gerald B. Pier, et Matthew P. DeLisa. 2018. « Immunization with Outer Membrane Vesicles Displaying Conserved Surface Polysaccharide Antigen Elicits Broadly Antimicrobial Antibodies ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (14): E3106- 15. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718341115>.
- Stewart, Balint, et Daniel E. Rozen. 2012. « Genetic Variation for Antibiotic Persistence in Escherichia Coli ». *Evolution* 66 (3): 933- 39. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01467.x>.
- Stewart, Philip S. 2003. « Diffusion in Biofilms ». *Journal of Bacteriology* 185 (5): 1485- 91. <https://doi.org/10.1128/JB.185.5.1485-1491.2003>.
- Stewart, Philip S., et Michael J. Franklin. 2008. « Physiological Heterogeneity in Biofilms ». *Nature Reviews Microbiology* 6 (3): 199- 210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>.
- Strober, Warren, Ivan Fuss, et Peter Mannon. 2007. « The fundamental basis of inflammatory bowel disease ». *Journal of Clinical Investigation* 117 (3): 514- 21. <https://doi.org/10.1172/JCI30587>.
- Strober, Warren, et Tomohiro Watanabe. 2011. « NOD2, an Intracellular Innate Immune Sensor Involved in Host Defense and Crohn's Disease ». *Mucosal immunology* 4 (5): 484- 95. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.29>.
- Suarez, Giovanni, Johanna C. Sierra, Jian Sha, Shaofei Wang, Tatiana E. Erova, Amin A. Fadl, Sheri M. Foltz, Amy J. Horneman, et Ashok K. Chopra. 2008. « Molecular Characterization of a Functional Type VI Secretion System from a Clinical Isolate of Aeromonas Hydrophila ». *Microbial Pathogenesis* 44 (4): 344- 61. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.10.005>.
- Sun-Wada, Ge-Hong, Hiroyuki Tabata, Nobuyuki Kawamura, Minako Aoyama, et Yoh Wada. 2009. « Direct Recruitment of H⁺-ATPase from Lysosomes for Phagosomal Acidification ». *Journal of Cell Science* 122 (14): 2504- 13. <https://doi.org/10.1242/jcs.050443>.
- « Survival of hunger and stress: The role of rpoS in early stationary phase gene regulation in E. coli - ScienceDirect ». s. d. Consulté le 24 septembre 2019. <https://www.sciencedirect-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/science/article/pii/S009286749390655A?via%3Dihub>.
- Sutherland, Ian W. 1999. « Polysaccharases for microbial exopolysaccharides ». *Carbohydrate Polymers* 38 (4): 319- 28. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00114-3).
- Svenningsen, Mikkel Skjoldan, Alexandra Veress, Alexander Harms, Namiko Mitarai, et Szabolcs Semsey. 2019. « Birth and Resuscitation of (p)PpGpp Induced Antibiotic Tolerant Persister Cells ». *Scientific Reports* 9 (1): 1- 13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42403-7>.
- Swidsinski, Alexander, Axel Ladhoff, Annelie Pernthaler, Sonja Swidsinski, Vera Loening-Baucke, Marianne Ortner, Jutta Weber, et al. 2002. « Mucosal flora in inflammatory bowel disease ». *Gastroenterology* 122 (1): 44- 54. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.30294>.
- Swidsinski, Alexander, Jutta Weber, Vera Loening-Baucke, Laura P. Hale, et Herbert Lochs. 2005. « Spatial Organization and Composition of the Mucosal Flora in Patients with Inflammatory Bowel Disease ». *Journal of Clinical Microbiology* 43 (7): 3380- 89. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3380-3389.2005>.
- Tamano, Koichi, Shin-Ichi Aizawa, Eisaku Katayama, Takashi Nonaka, Shinobu Imajoh-Ohmi, Asaomi Kuwae, Shinya Nagai, et Chihiro Sasakawa. 2000. « Supramolecular structure of the Shigella type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors ». *The EMBO Journal* 19 (15): 3876- 87. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.15.3876>.
- Tamman, Hedvig, Andres Ainelo, Kadi Ainsaar, et Rita Hõrak. 2014. « A Moderate Toxin, GraT, Modulates Growth Rate and Stress Tolerance of Pseudomonas Putida ». *Journal of Bacteriology* 196 (1): 157- 69. <https://doi.org/10.1128/JB.00851-13>.
- Tauber, Alfred I. 2003. « Metchnikoff and the Phagocytosis Theory ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (11): 897- 901. <https://doi.org/10.1038/nrm1244>.
- Tawfik, Ahmed, Paul K. Flanagan, et Barry J. Campbell. 2014. « Escherichia Coli-Host Macrophage Interactions in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease ». *World Journal of Gastroenterology* 20 (27): 8751- 63. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i27.8751>.
- Taylor, Jonathan D., et Steve J. Matthews. 2015. « New Insight into the Molecular Control of Bacterial Functional Amyloids ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00033>.
- Tebo, Alison G., et Arnaud Gautier. 2019. « A Split Fluorescent Reporter with Rapid and Reversible Complementation ». *Nature Communications* 10 (1): 2822. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10855-0>.

- Thomas, Wendy E., Elena Trintchina, Manu Forero, Viola Vogel, et Evgeni V. Sokurenko. 2002. « Bacterial Adhesion to Target Cells Enhanced by Shear Force ». *Cell* 109 (7): 913- 23. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00796-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00796-1).
- Tolker-Nielsen, Tim. 2015. « Biofilm Development ». *Microbiology Spectrum* 3 (2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014>.
- Torti, Frank M., et Suzy V. Torti. 2002. « Regulation of Ferritin Genes and Protein ». *Blood* 99 (10): 3505- 16. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3505>.
- Toyofuku, Masanori, Tomohiro Inaba, Tatsunori Kiyokawa, Nozomu Obana, Yutaka Yawata, et Nobuhiko Nomura. 2016. « Environmental Factors That Shape Biofilm Formation ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80 (1): 7- 12. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1058701>.
- Troxell, Bryan, et Hosni M. Hassan. 2013. « Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00059>.
- Tysk, C., E. Lindberg, G. Järnerot, et B. Flodérus-Myrhed. 1988. « Ulcerative Colitis and Crohn's Disease in an Unselected Population of Monozygotic and Dizygotic Twins. A Study of Heritability and the Influence of Smoking. » *Gut* 29 (7): 990- 96. <https://doi.org/10.1136/gut.29.7.990>.
- Urbanowski, M. L., L. T. Stauffer, et G. V. Stauffer. 2000. « The GcvB Gene Encodes a Small Untranslated RNA Involved in Expression of the Dipeptide and Oligopeptide Transport Systems in Escherichia Coli ». *Molecular Microbiology* 37 (4): 856- 68. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02051.x>.
- Uribe-Querol, Eileen, et Carlos Rosales. 2017. « Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens ». *Frontiers in Immunology* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01368>.
- Valdebenito, Marianne, Alvin L. Crumbliss, Günther Winkelmann, et Klaus Hantke. 2006. « Environmental Factors Influence the Production of Enterobactin, Salmochelin, Aerobactin, and Yersiniabactin in Escherichia Coli Strain Nissle 1917 ». *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 296 (8): 513- 20. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.06.003>.
- Valentini, Martina, et Alain Filloux. 2016. « Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from Pseudomonas aeruginosa and Other Bacteria ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (24): 12547- 55. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.711507>.
- Valle, Jaione, Marta Vergara-Irigaray, Nekane Merino, José R. Penadés, et Iñigo Lasa. 2007. « σ B Regulates IS256-Mediated Staphylococcus aureus Biofilm Phenotypic Variation ». *Journal of Bacteriology* 189 (7): 2886- 96. <https://doi.org/10.1128/JB.01767-06>.
- Van den Bergh, Bram, Joran E. Michiels, Tom Wenseleers, Ethel M. Windels, Pieterjan Vanden Boer, Donaat Kestemont, Luc De Meester, et al. 2016. « Frequency of Antibiotic Application Drives Rapid Evolutionary Adaptation of Escherichia Coli Persistence ». *Nature Microbiology* 1 (mars): 16020. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.20>.
- VAN GENNIP, MARIA, LOUISE DAHL CHRISTENSEN, MORTEN ALHEDE, RICHARD PHIPPS, PETER ØSTRUP JENSEN, LARS CHRISTOPHERSEN, SÛNJE JOHANNA PAMP, et al. 2009. « Inactivation of the rhlA gene in Pseudomonas aeruginosa prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes ». *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 117 (7): 537- 46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02466.x>.
- Vázquez-Laslop, Nora, Hyunwoo Lee, et Alexander A. Neyfakh. 2006. « Increased Persistence in Escherichia Coli Caused by Controlled Expression of Toxins or Other Unrelated Proteins ». *Journal of Bacteriology* 188 (10): 3494- 97. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3494-3497.2006>.
- Vega, Nicole M., Kyle R. Allison, Ahmad S. Khalil, et James J. Collins. 2012. « Signaling-Mediated Bacterial Persister Formation ». *Nature chemical biology* 8 (5): 431- 33. <https://doi.org/10.1038/nchembio.915>.
- Verstraeten, Natalie, Wouter Joris Knapen, Cyrielle Ines Kint, Veerle Liebens, Bram Van den Bergh, Liselot Dewachter, Joran Elie Michiels, et al. 2015. « O₂ and Membrane Depolarization Are Part of a Microbial Bet-Hedging Strategy that Leads to Antibiotic Tolerance ». *Molecular Cell* 59 (1): 9- 21. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.011>.
- Vidal, O., R. Longin, C. Prigent-Combaret, C. Dorel, M. Hooreman, et P. Lejeune. 1998. « Isolation of an Escherichia Coli K-12 Mutant Strain Able to Form Biofilms on Inert Surfaces: Involvement of a New OmpR Allele That Increases Curli Expression ». *Journal of Bacteriology* 180 (9): 2442- 49.
- Viducic, Darija, Tsuneko Ono, Keiji Murakami, Heni Susilowati, Shizuo Kayama, Katsuhiko Hirota, et Yoichiro Miyake. 2006. « Functional Analysis of SpoT, RelA and DksA Genes on Quinolone Tolerance in Pseudomonas Aeruginosa under Nongrowing Condition ». *Microbiology and Immunology* 50 (4): 349- 57. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2006.tb03793.x>.

- Vogel, Jörg, Liron Argaman, E. Gerhart H. Wagner, et Shoshy Altuvia. 2004. « The Small RNA IstR Inhibits Synthesis of an SOS-Induced Toxic Peptide ». *Current Biology* 14 (24): 2271-76. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.12.003>.
- Vorwerk, Stephanie, Viktoria Krieger, Jörg Deiwick, Michael Hensel, et Nicole Hansmeier. 2015. « Proteomes of Host Cell Membranes Modified by Intracellular Activities of *Salmonella enterica* ». *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 14 (1): 81-92. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.041145>.
- Vuong, Cuong, Jovanka M. Voyich, Elizabeth R. Fischer, Kevin R. Braughton, Adeline R. Whitney, Frank R. DeLeo, et Michael Otto. 2004. « Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA) Protects *Staphylococcus Epidermidis* against Major Components of the Human Innate Immune System ». *Cellular Microbiology* 6 (3): 269-75.
- Walker, Travis S., Kerry L. Tomlin, G. Scott Worthen, Katie R. Poch, Jonathan G. Lieber, Milene T. Saavedra, Michael B. Fessler, Kenneth C. Malcolm, Michael L. Vasil, et Jerry A. Nick. 2005. « Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development Mediated by Human Neutrophils ». *Infection and Immunity* 73 (6): 3693-3701. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3693-3701.2005>.
- Walters, Marshall C., Frank Roe, Amandine Bugnicourt, Michael J. Franklin, et Philip S. Stewart. 2003. « Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (1): 317-23. <https://doi.org/10.1128/aac.47.1.317-323.2003>.
- Wandersman, Cécile, et Philippe Delepelaire. 2004. « Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores ». *Annual Review of Microbiology* 58 (1): 611-47. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123811>.
- Wang, Tietao, Meiru Si, Yunhong Song, Wenhan Zhu, Fen Gao, Yao Wang, Lei Zhang, et al. 2015. « Type VI Secretion System Transports Zn²⁺ to Combat Multiple Stresses and Host Immunity ». *PLOS Pathogens* 11 (7): e1005020. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005020>.
- Wang, Xin, James F. Preston, et Tony Romeo. 2004. « The PgaABCD Locus of *Escherichia Coli* Promotes the Synthesis of a Polysaccharide Adhesin Required for Biofilm Formation ». *Journal of Bacteriology* 186 (9): 2724-34. <https://doi.org/10.1128/jb.186.9.2724-2734.2004>.
- Watarai, M., T. Tobe, M. Yoshikawa, et C. Sasakawa. 1995. « Disulfide Oxidoreductase Activity of *Shigella Flexneri* Is Required for Release of Ipa Proteins and Invasion of Epithelial Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (11): 4927-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.11.4927>.
- Waterman, Scott R., et David W. Holden. 2003. « Functions and Effectors of the *Salmonella* Pathogenicity Island 2 Type III Secretion System ». *Cellular Microbiology* 5 (8): 501-11.
- Watnick, P. I., et R. Kolter. 1999. « Steps in the Development of a *Vibrio Cholerae* El Tor Biofilm ». *Molecular Microbiology* 34 (3): 586-95. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01624.x>.
- Webb, J. L., M. W. Harvey, D. W. Holden, et T. J. Evans. 2001. « Macrophage Nitric Oxide Synthase Associates with Cortical Actin but Is Not Recruited to Phagosomes ». *Infection and Immunity* 69 (10): 6391-6400. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6391-6400.2001>.
- Weber, Barbara, Medisa Hasic, Chang Chen, Sun Nyunt Wai, et Debra L. Milton. 2009. « Type VI secretion modulates quorum sensing and stress response in *Vibrio anguillarum* ». *Environmental Microbiology* 11 (12): 3018-28. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02005.x>.
- Weber, Harald, Tino Polen, Johanna Heuveling, Volker F. Wendisch, et Regine Hengge. 2005. « Genome-Wide Analysis of the General Stress Response Network in *Escherichia coli*: σ^S -Dependent Genes, Promoters, and Sigma Factor Selectivity ». *Journal of Bacteriology* 187 (5): 1591-1603. <https://doi.org/10.1128/JB.187.5.1591-1603.2005>.
- Weber, Mary M., et Robert Faris. 2018. « Subversion of the Endocytic and Secretory Pathways by Bacterial Effector Proteins ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6 (janvier). <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00001>.
- Wehkamp, Jan, Martin Götz, Klaus Herrlinger, Wolfgang Steurer, et Eduard F Stange. 2016. « Inflammatory Bowel Disease ». *Deutsches Ärzteblatt International* 113 (5): 72-82. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0072>.
- Wehkamp, Jan, Nita H. Salzman, Edith Porter, Sabine Nuding, Michael Weichenthal, Robert E. Petras, Bo Shen, et al. 2005. « Reduced Paneth cell α -defensins in ileal Crohn's disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (50): 18129-34. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505256102>.

- Wencewicz, Timothy A., Timothy E. Long, Ute Möllmann, et Marvin J. Miller. 2013. « Trihydroxamate Siderophore-Fluoroquinolone Conjugates are Selective Sideromycin Antibiotics that Target *Staphylococcus aureus* ». *Bioconjugate chemistry* 24 (3): 473- 86. <https://doi.org/10.1021/bc300610f>.
- White, Carine, Jaekwon Lee, Taiho Kambe, Kevin Fritsche, et Michael J. Petris. 2009a. « A Role for the ATP7A Copper-Transporting ATPase in Macrophage Bactericidal Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (49): 33949- 56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.070201>.
- . 2009b. « A Role for the ATP7A Copper-transporting ATPase in Macrophage Bactericidal Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (49): 33949- 56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.070201>.
- Whiteley, Marvin, M. Gita Bangera, Roger E. Bumgarner, Matthew R. Parsek, Gail M. Teitzel, Stephen Lory, et E. P. Greenberg. 2001. « Gene Expression in *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms ». *Nature* 413 (6858): 860- 64. <https://doi.org/10.1038/35101627>.
- Wilson, Briana R., Alexander R. Bogdan, Masaki Miyazawa, Kazunori Hashimoto, et Yoshiaki Tsuji. 2016. « Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential ». *Trends in molecular medicine* 22 (12): 1077- 90. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.10.005>.
- Wine, Eytan, Juan C Ossa, Scott D Gray-Owen, et Philip M Sherman. 2009. « Adherent-invasive *Escherichia coli*, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia ». *BMC Microbiology* 9 (août): 180. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-180>.
- Wong, Alexander R. C., Jaclyn S. Pearson, Michael D. Bright, Diana Munera, Keith S. Robinson, Sau Fung Lee, Gad Frankel, et Elizabeth L. Hartland. 2011. « Enteropathogenic and Enterohaemorrhagic *Escherichia Coli*: Even More Subversive Elements ». *Molecular Microbiology* 80 (6): 1420- 38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07661.x>.
- Wu, X. R., T. T. Sun, et J. J. Medina. 1996. « In Vitro Binding of Type 1-Fimbriated *Escherichia Coli* to Uroplakins Ia and Ib: Relation to Urinary Tract Infections ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (18): 9630- 35. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9630>.
- Yang, Jinming, et Ann J. Richmond. 2009. « MONITORING NF- κ B MEDIATED CHEMOKINE TRANSCRIPTION IN TUMORIGENESIS ». *Methods in enzymology* 460: 347- 55. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)05217-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)05217-3).
- Yu, J., H. Webb, et T. R. Hirst. 1992. « A Homologue of the *Escherichia Coli* DsbA Protein Involved in Disulphide Bond Formation Is Required for Enterotoxin Biogenesis in *Vibrio Cholerae* ». *Molecular Microbiology* 6 (14): 1949- 58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01368.x>.
- Yu, Linda Chia-Hui. 2018. « Microbiota dysbiosis and barrier dysfunction in inflammatory bowel disease and colorectal cancers: exploring a common ground hypothesis ». *Journal of Biomedical Science* 25 (novembre). <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0483-8>.
- Yu, Shan, Qing Wei, Tianhu Zhao, Yuan Guo, et Luyan Z. Ma. 2016. « A Survival Strategy for *Pseudomonas Aeruginosa* That Uses Exopolysaccharides To Sequester and Store Iron To Stimulate Psl-Dependent Biofilm Formation ». *Applied and Environmental Microbiology* 82 (21): 6403- 13. <https://doi.org/10.1128/AEM.01307-16>.
- Zogaj, X., M. Nimtz, M. Rohde, W. Bokranz, et U. Römling. 2001. « The Multicellular Morphotypes of *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia Coli* Produce Cellulose as the Second Component of the Extracellular Matrix ». *Molecular Microbiology* 39 (6): 1452- 63. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02337.x>.
- Zouiten-Mekki, Lilia, Meriem Serghini, Monia Fekih, Lamia Kallel, Samira Matri, Nadia Ben Mustapha, Jalel Boubaker, et Azza Filali. 2013. « Rôle de la cellule épithéliale dans l'homéostasie intestinale et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ». *médecine/sciences* 29 (12): 1145- 50. <https://doi.org/10.1051/medsci/20132912019>.

Partie 9 : Microscopie électronique des macrophages infectés par LF82

Afin de visualiser la matrice extracellulaire produite dans les vacuoles des macrophages contenant LF82, j'ai mis au point en collaboration avec Alexis Canette du service de microscopie électronique de l'institut de Biologie Paris Seine – Jussieu, un protocole nous permettant de réaliser de la cryomicroscopie sur les macrophages infectés.

Nous avons d'abord mis en images la formation de biofilm *in vitro* par la bactérie cultivée en LB, en condition statique durant 24h à 37°C°. Pour ces expériences, j'ai choisi comme témoin négatif le mutant pour le gène *csgD* qui régule la formation de curli et cellulose notamment. Dans les conditions *in vitro*, la différence entre les deux souches sauvage et mutante est visible. La souche sauvage produit une matrice épaisse bien différenciable, absente chez la mutante *csgD* (Figure 50).

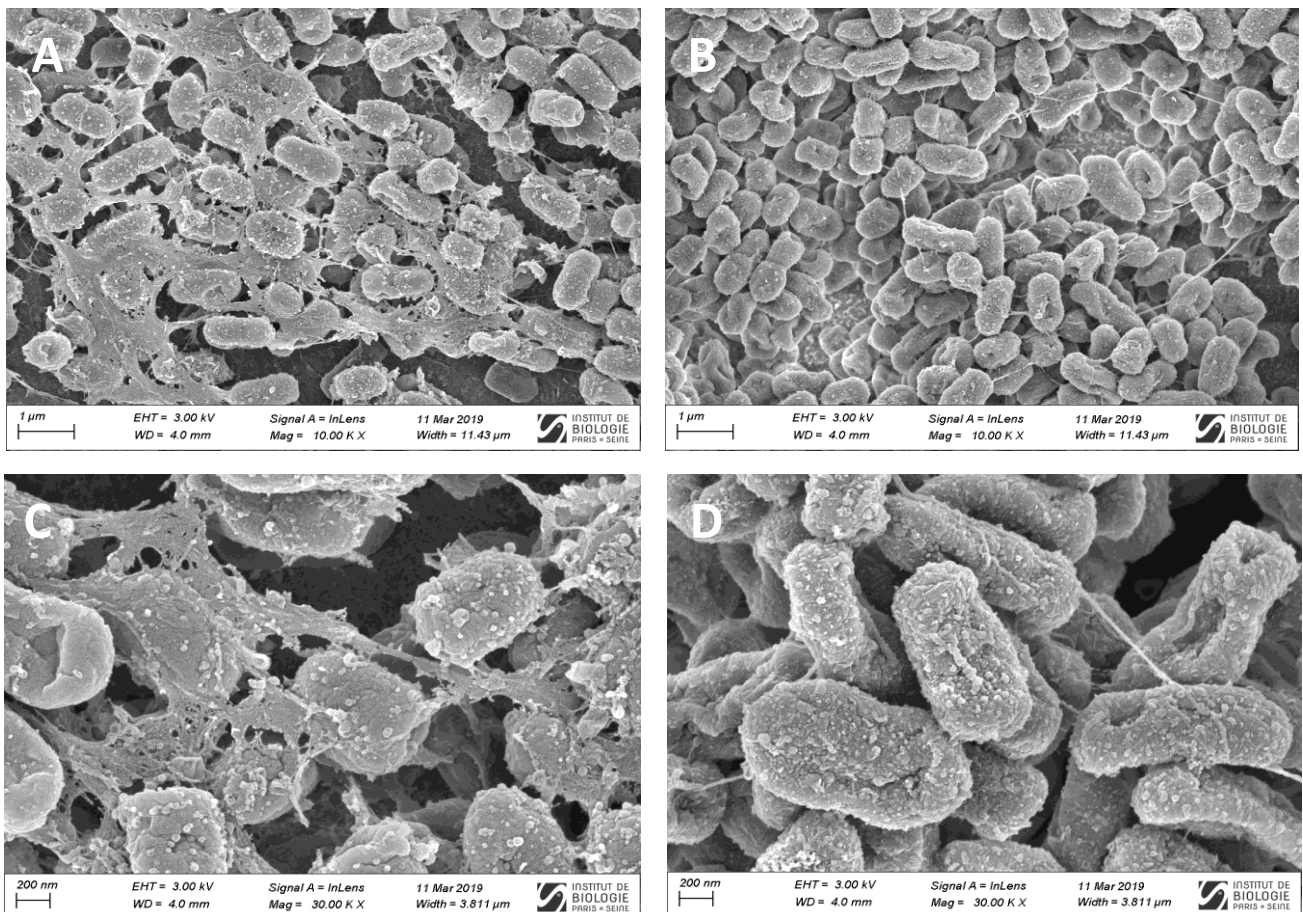


Figure 50 - Biofilm de la souche LF82 *in vitro*. 2mL de culture à DO 0.1 cultivé dans des puits individuels IBIDI durant 24h (A-C) LF82 WT Mag=10.00KX et 30.00KX (B-D) LF82 $\Delta csgD$ Mag=10.00KX et 30.00KX

Pour visualiser la matrice extracellulaire *ex vivo* dans les macrophages, nous avons d'abord utilisé un protocole à base de Triton nous permettant de retirer les membranes du macrophage. Nous observons des IBC avec ce protocole (Figure 2) mais l'analyse de la matrice extracellulaire est compliquée par deux problèmes majeurs. Le premier problème est que de nombreux filaments sont observés et la plupart semble appartenir aux cellules eucaryotes (actines, etc.). Les filaments appartenant aux bactéries sont difficiles à dissocier (**Figure 51**). Le second problème est qu'avec le contrôle LF82 $\Delta csgD$, nous n'avons observé aucun foyer bactérien, sûrement parce que ceux-ci sont moins fréquents et peut être plus facilement décrochés des cellules que la souche LF82 WT.

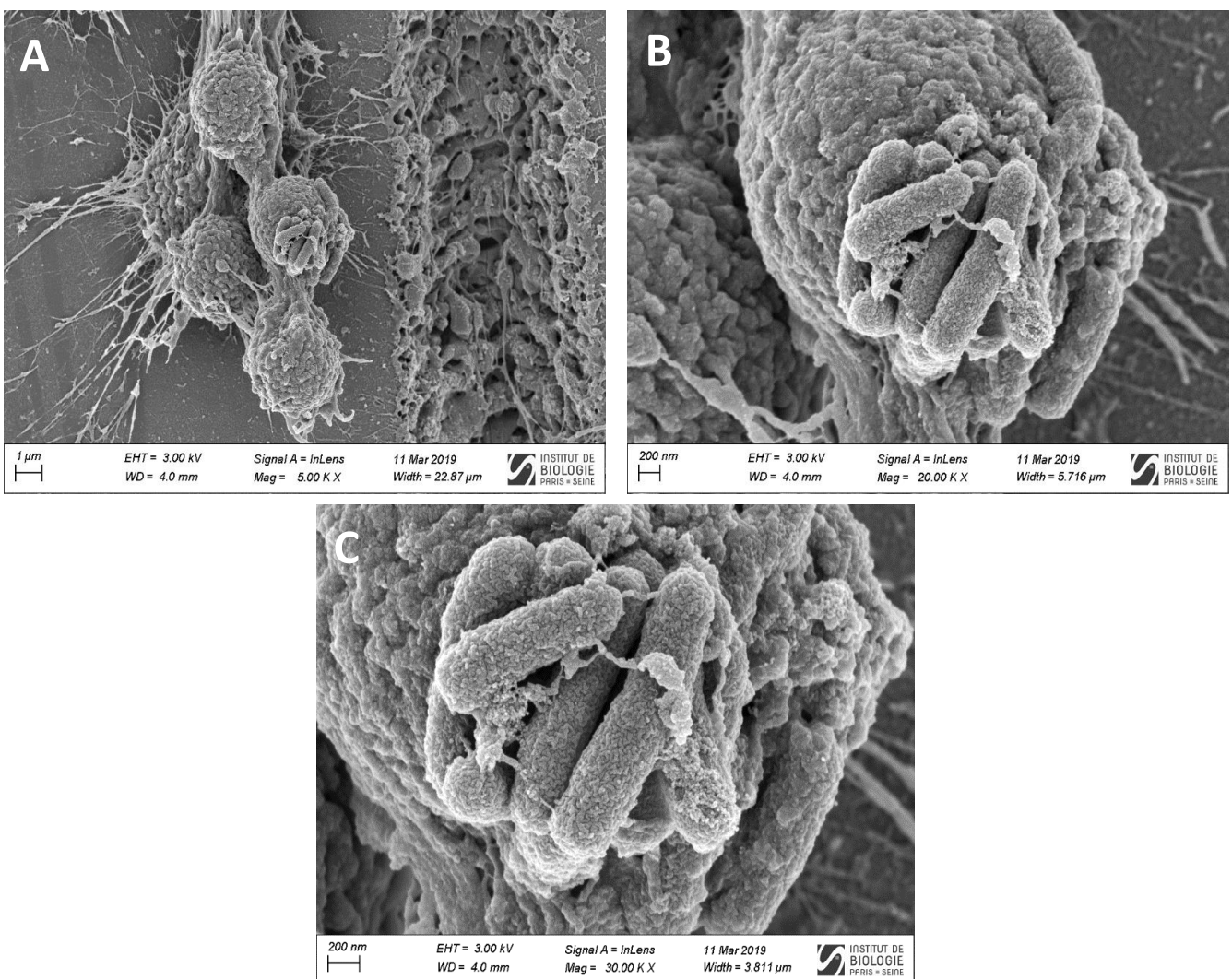


Figure 51 – Microscopie électronique des macrophages RAW 24h post infection par la bactérie LF82. A- Mag=5.00KX B- Mag=20.00KX C- Mag=30.00KX

Nous avons donc adopté une stratégie différente de cryomicroscopie qui permet de maintenir les échantillons dans un état quasiment physiologique, figés de manière instantanée. Les macrophages infectés et fixés au préalable sont déposés dans des coupelles de 2mm de diamètre puis congelés à haute pression dans de l'azote liquide. À l'aide d'une lame, on fracture ensuite notre échantillon, cette fracture suit les plans de fragilité naturelle de l'échantillon. La fracture peut ensuite être sublimée en retirant la glace autour des éléments prisonniers dans l'échantillon pour dévoiler un peu plus les structures d'intérêts. Pour améliorer le signal, on dépose une fine couche de platine avant d'observer en microscopie à balayage (**Figure 52**).

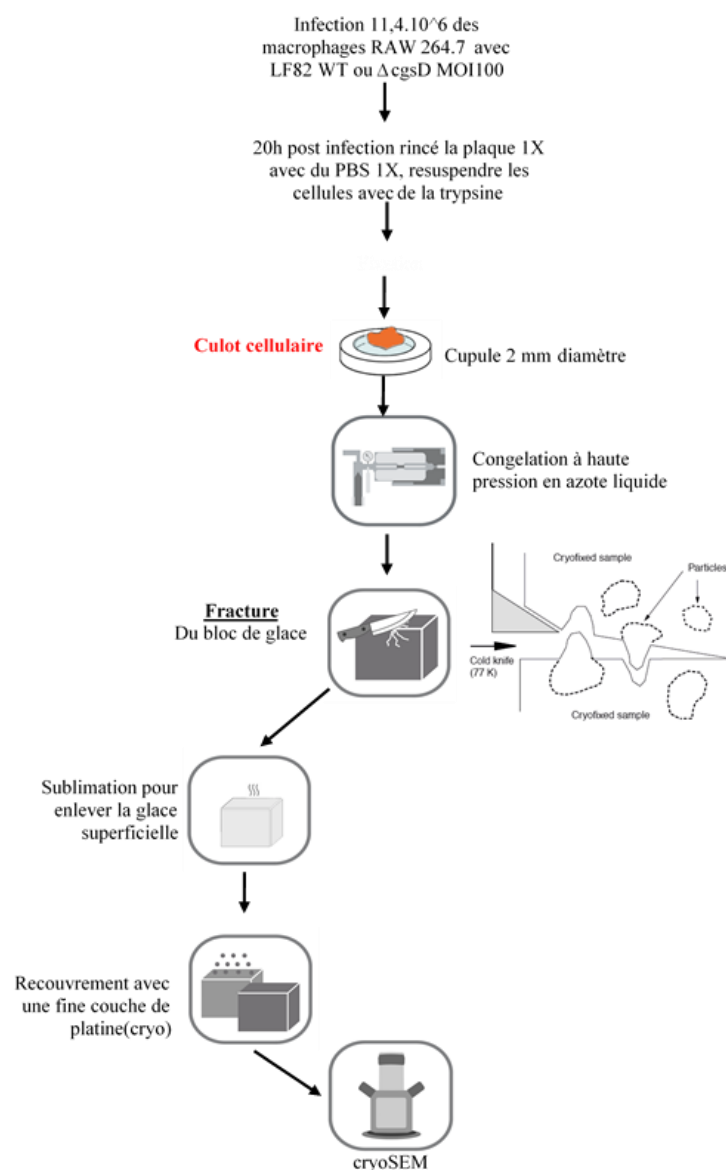


Figure 52 Schéma du protocole de cryomicroscopie pour visualiser la matrice extracellulaire produite par LF82 durant l'infection des macrophages RAW.

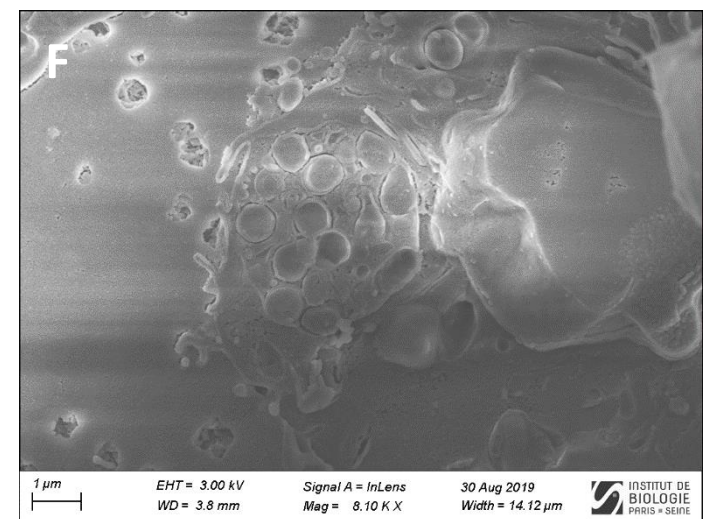
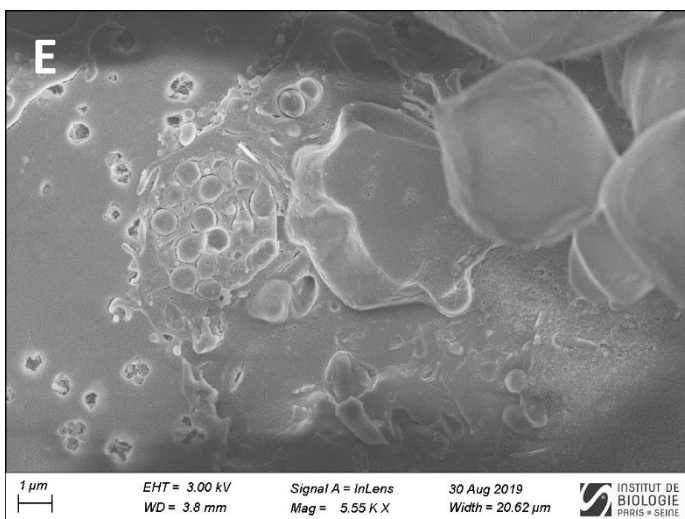
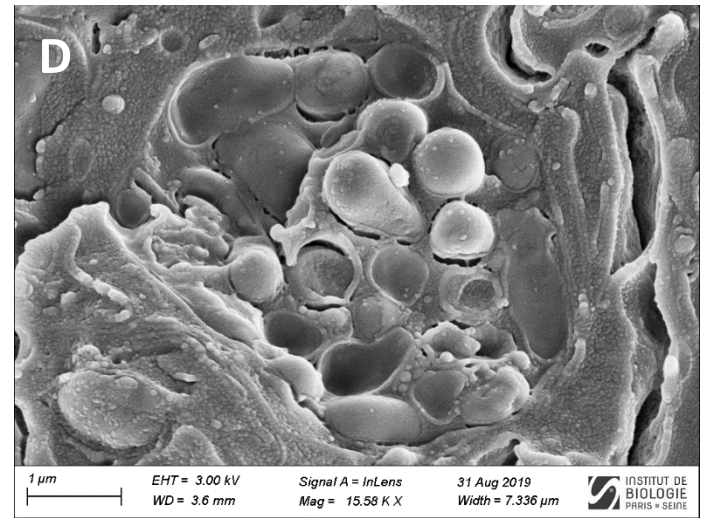
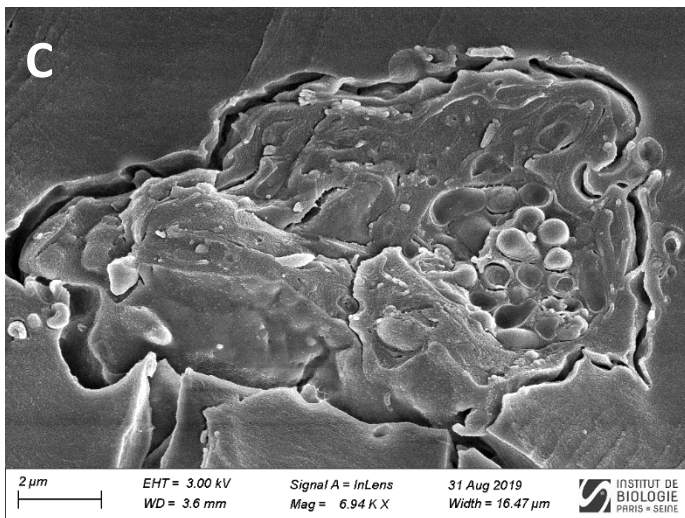
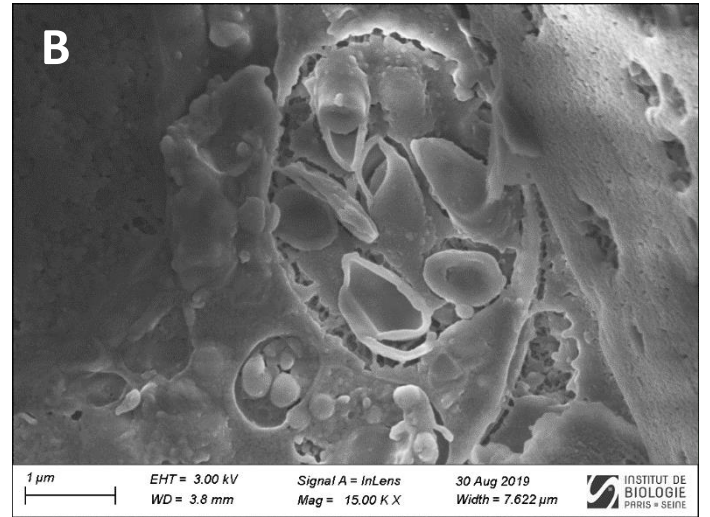
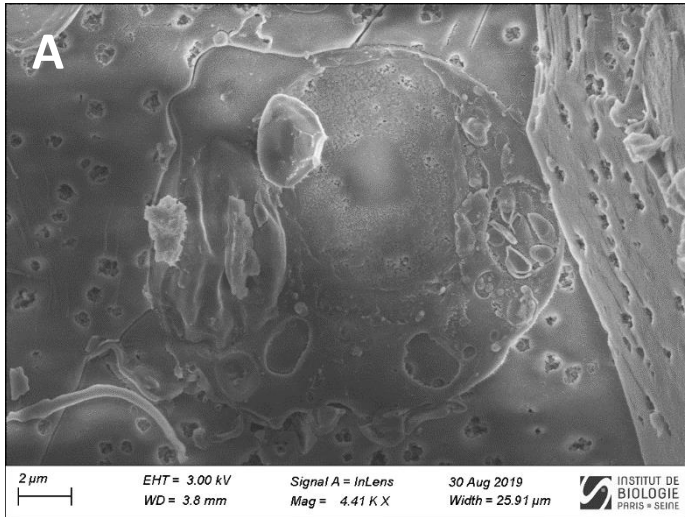


Figure 53 - Cryomicroscopie SEM 24h post infection des macrophages RAW par LF82 WT. Fracture de trois macrophages infectés par LF82 – (A-B) macrophage 1 Mag=4.41KX et 15.00KX (C-D) macrophage 2 Mag=6.94KX et 15.56KX (E-F) macrophage 3 Mag=5.55KX et 8.10KX.

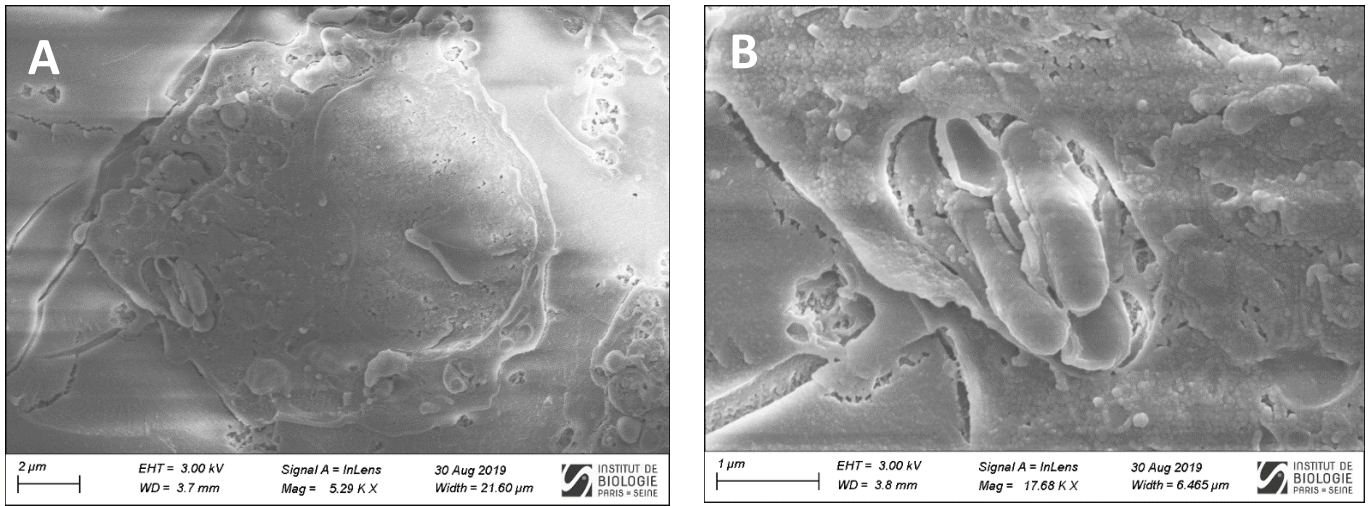


Figure 54 Cryomicroscopie SEM 24h post infection des macrophages RAW par LF82 Δ csgD.

Fracture d'un macrophage infecté par LF82 Δ csgD – A) Mag=5.29KX -B) Mag=17.68KX

Dans cette expérience de cryomicroscopie, on observe la présence d'une membrane lâche autour de chaque bactérie présente dans les vacuoles (**Figure 53**). Ce résultat encourageant est toutefois à nuancer, car nous avons également observé cette membrane avec le mutant *csgD* (**Figure 54**). Il pourrait donc s'agir d'une capsule ou d'exopolysaccharides non régulés par CsgD. Par ailleurs, la présence de cette membrane autour des bactéries ressemble à ce que l'on obtient en microscopie confocale lors d'un marquage des lectines (**Figure 55**). On observe dans ce cas un marquage présent autour des bactéries LF82 mais également autour de C600, une bactérie non pathogène, lorsqu'elle se trouve dans la même vacuole que LF82. Ceci semble exclure l'hypothèse de la capsule qui serait spécifiquement associée à la bactérie qui la produit. A posteriori, nous pouvons penser que le choix du mutant *csgD* dans cette expérience n'était pas optimal. L'utilisation d'un double mutant *pgaABCD-cgsD* ou de simples mutants *pgaABCD* ou *csgAB* permettrait de déterminer plus précisément le type de structure observée.

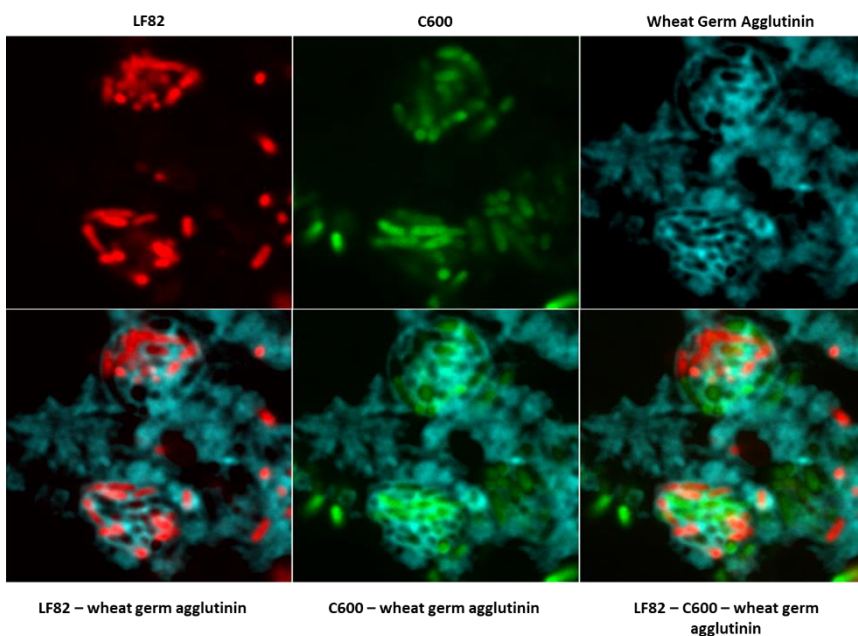


Figure 55 Marquage de la lectine WGA 24h post infection des macrophages RAW par LF82 et C600. Coinfection LF82(rouge) et C600(vert) avec marquage de la lectine Wheat Germ Agglutinin (WGA)(Cyan)

Partie 10 : Caractérisation d'un système de sécrétion de type VI putatif

Les systèmes de sécrétion de type VI (T6SS) sont des complexes trans-enveloppes permettant la translocation de toxines bactériennes chez des cibles eucaryotes ou procaryotes. Les T6SS sont hautement impliqués dans la pathogénicité. La combinaison d'une approche génomique combinant RNA-seq (transcriptome) et Tn-seq (identification des gènes essentiels) de la souche d'*Escherichia coli* LF82 au cours de l'infection des macrophages a permis d'identifier un nouveau système potentiel de sécrétion de type VI (T6SS). Ce système est surexprimé dans le macrophage et plusieurs des gènes qui le composent présentent un désavantage sélectif lorsqu'ils sont interrompus par un transposon (**Figure 56**).

Ce chapitre décrit les premiers résultats obtenus sur la caractérisation de ce système. Ces travaux préliminaires ont été réalisés par Antinéa Ravet une stagiaire de Master 1 de Sorbonne Université que j'ai encadré.

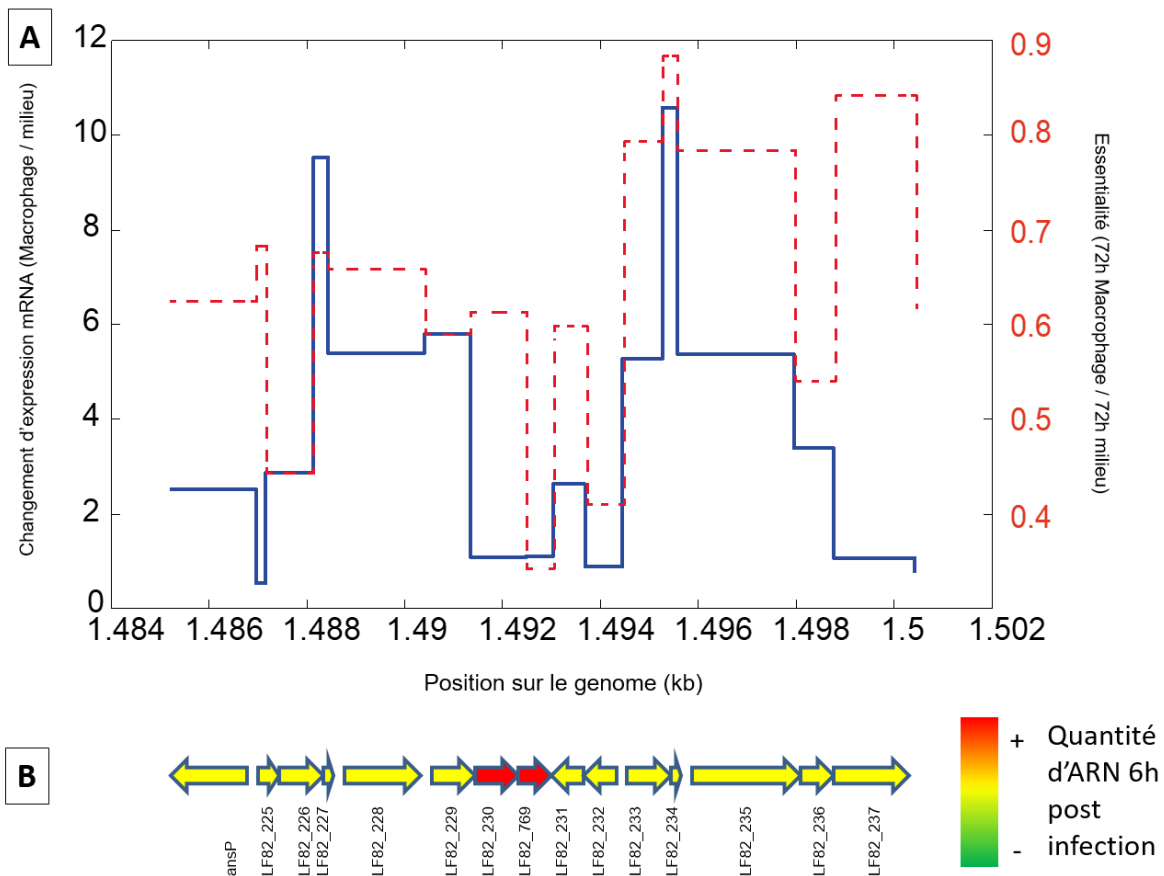


Figure 56 : Résultats du Tn seq et du RNA seq superposés au cluster de gènes du T6SS. Les parties (A) et (B) de la figure sont liées : la position du cluster de gènes est donnée par l'axe des

abscisses du graphique. Le graphe permet donc de visualiser les résultats de chaque gène représenté. (A) L'axe des ordonnées de gauche indique les changements d'expression des ARNm de LF82 WT en macrophages normalisés par l'expression des ARNm de la souche en milieu de culture des macrophages (DMEM). Lorsque la valeur de la courbe bleue est

Le système de sécrétion de type VI regroupe les protéines membranaires (TssL, TssJ, et TssM), les protéines du tube (Hcp, VgrG), et les protéines entourant le tube du T6SS (TssB/TssC). Par un effet de contraction, la gaine va permettre la perforation d'une cellule proche lors d'un contact par la projection du tube d'Hcp. Ce dernier est surmonté du pic VgrG terminé par la protéine PAAR qui aiguisé le système chez la bactérie, la gaine se forme dans le cytoplasme en assemblant les sous-unités TssB/TssC. Le tube constitué d'un assemblage de protéines Hcp est chargé de protéines effectrices et le décrochement de VgrG va permettre leur libération. Les protéines membranaires TssL et TssM forment une plaque d'ancrage (baseplate) du T6SS (**Figure 57**). Le locus T6SS potentiel présente deux gènes codants pour des protéines homologues à VgrG et une protéine homologue à une protéine PAAR. L'expression très forte lors de l'infection ARNm des protéine LF82_230 et LF82_769 suggère qu'il pourrait s'agir des protéines de la gaine ou du tube qui nécessitent de nombreux monomères. _

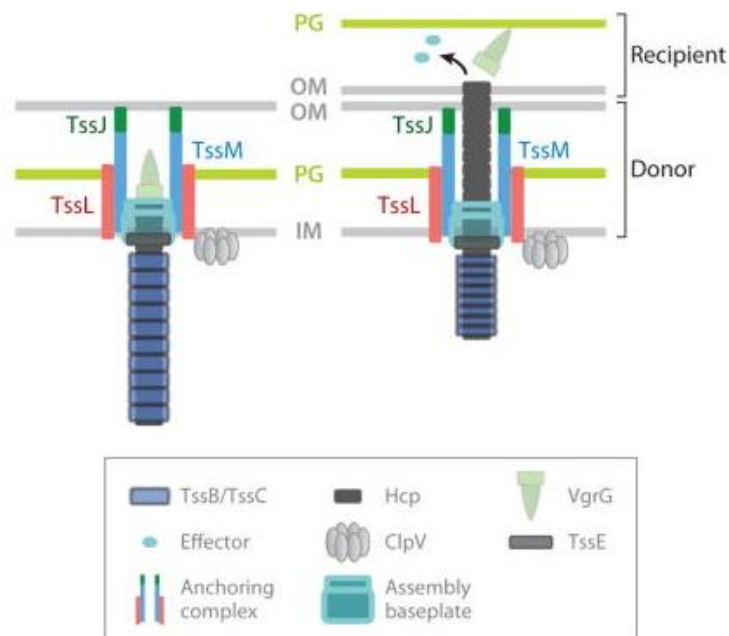


Figure 57 : Protéines de l'appareil de sécrétion de Type VI

1 – Implication du T6SS putatif dans la survie dans les macrophages

Pour étudier l'implication du T6SS lors de l'infection, nous avons délété le cluster T6SS en entier ainsi que certains gènes individuels du cluster pour déterminer leur importance dans le système. J'ai sélectionné le gène LF82_227, ce gène est fortement induit dans le RNA-seq lors de l'infection, il pourrait coder pour la protéine PAAR du T6SS et les gènes LF82_769 et LF82_230 ne présentant pas d'homologies significatives avec des protéines de fonction connue mais fortement exprimées. Les protéines LF82_769 et LF82_230 pourraient constituer le tube du T6SS. Nous avons infecté des macrophages murins RAW 264.7 avec les souches LF82 Δ 227, Δ 769, Δ T6SS, Δ PAI II (îlot de pathogénicité caractérisé montrant un profil d'expression similaire au T6SS) et la souche Δ ompR (un gène majeur pour la survie de LF82, utilisé comme contrôle positif). Les trois délétions dans le cluster T6SS affectent la survie dans le macrophage à un niveau comparable à l'îlot de pathogénicité 2 (**Figure 58**).

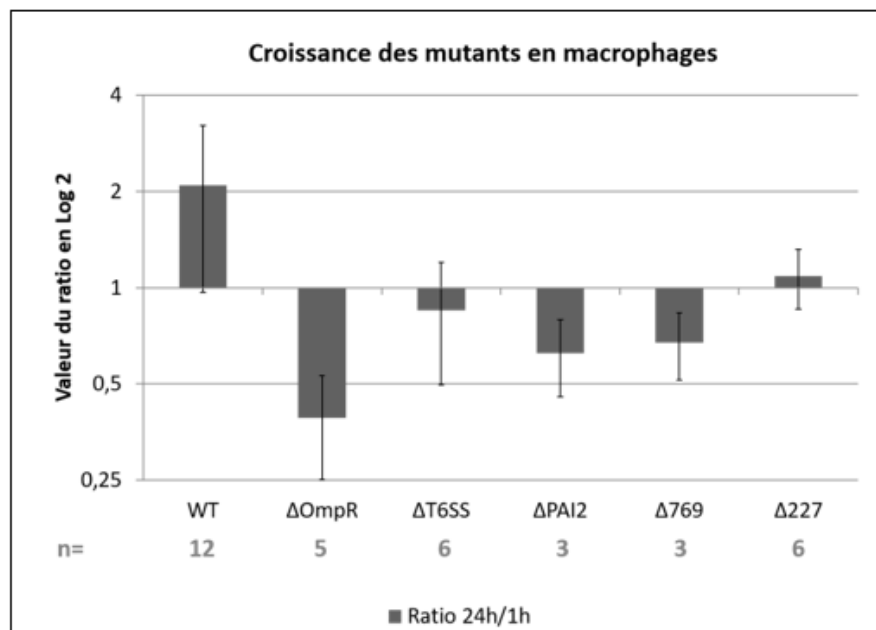


Figure 58 : Représentation graphique du ratio des CFU 24h/1h après infection dans les macrophages murins RAW 264.7. Le ratio 24h/1h détermine la survie de la souche dans les macrophages. Le log₂ du ratio est représenté, lorsque le ratio dépasse 1, les bactéries prolifèrent. Ces résultats sont issus des moyennes des répliques (n).

2 - Etude du phénotype d'infection des mutants de délétion du T6SS en macrophages murins

RAW 264.7

Pour étudier l'implication du T6SS dans l'infection des macrophages et la formation de communautés intracellulaires (IBC), nous avons mesuré le nombre de bactéries par foci 24h après infection. Avec la souche sauvage, nous observons fréquemment de larges foyers bactériens (**Figure 59A et 59E**). La souche délétée du T6SS produit moins fréquemment de larges foyers (**Figure 59B et 4E**). Les profils des mutants $\Delta 227$ et $\Delta 769$ sont similaires à celui du Δ T6SS : les bactéries vues en microscopie sont majoritairement isolées (**Figure 59C et D**). Comme la souche LF82 Δ T6SS, ces mutants sont dans 50% des cas isolés dans le macrophage (**Figure 59F**). La délétion du T6SS semble donc impacter la formation de foyer de division bactérienne au sein des macrophages.

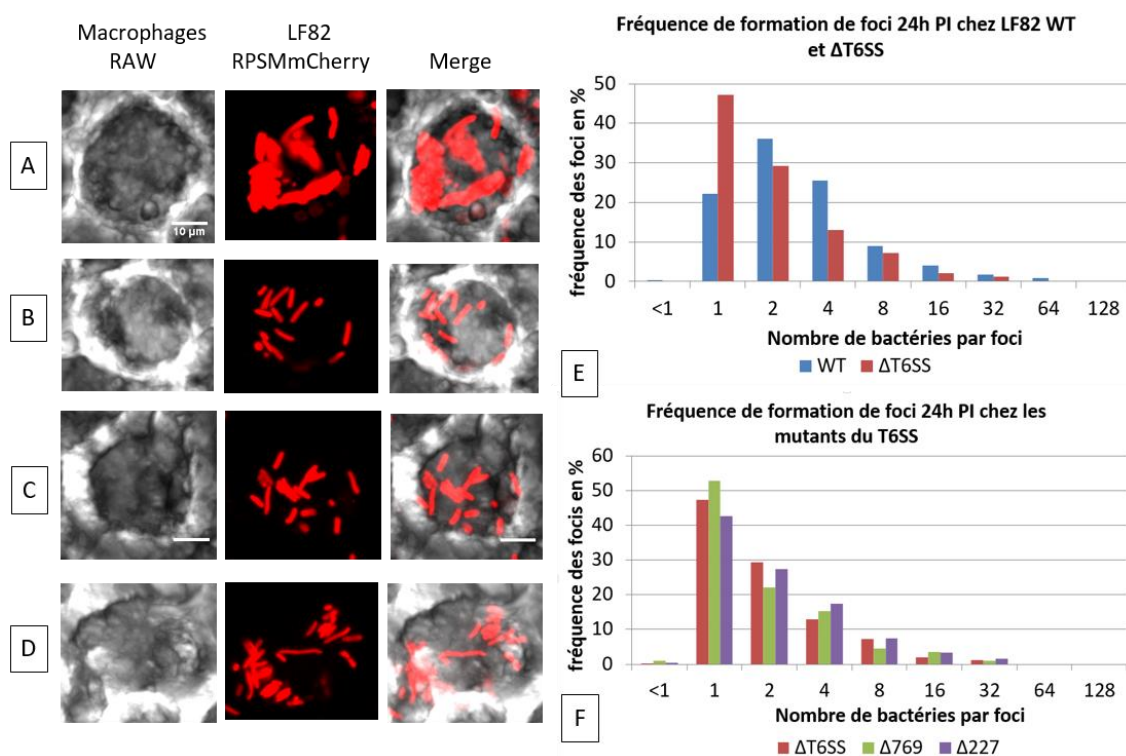


Figure 59 : Microscopie et représentation graphique de la formation de foyer des mutants du T6SS en comparaison avec la souche sauvage 24h post infection (PI) en macrophages murins RAW 264.7. Tous les panels de microscopie sont en macrophages RAW MOI 50 24h PI. (A) Profil de LF82 WT RPSM ::mCherry. (B) Profil de LF82 Δ T6SS RPSM :: mCherry. (C) Profil de LF82 Δ 227 RPSM ::mCherry. (D) Profil de LF82 Δ 769 RPSM :: mCherry. Echelle de la microscopie : 10 μ m. (E) Fréquences des foci observés selon leur taille (le nombre de bactéries est estimé en fonction de

l'aire de l'objet fluorescent) chez LF82 sauvage et LF82 Δ T6SS 24h PI obtenues grâce aux acquisitions de microscopie. (F) Fréquences des foci observés selon leur taille (nombre de bactéries contenues par amas) chez LF82 Δ T6SS, LF82 Δ 227 et LF82 Δ 769 24h PI obtenues grâce aux acquisitions de microscopies.

3- Suivi de l'expression de T6SS putatif au cours de l'infection

J'ai construit une souche LF82 769-GFP afin de suivre l'expression de la protéine 769 au cours de l'infection. Nous avons réalisé des courbes de croissance de la souche LF82_769 à deux températures 30 et 37°C en LB. La souche contenant la fusion se multiplie à la même vitesse que la souche sauvage. Cette fusion n'est pas toxique pour la croissance de la bactérie *in vitro* en comparaison à une souche sauvage (**Figure 60**) et elle ne réduit pas la survie dans les macrophages lors de l'infection (**Figure 61**). Durant la croissance exponentielle, la vaste majorité des bactéries présentent une fluorescence diffuse (**Figure 60A à 60G**). En revanche, à 37°C dans la culture à saturation, nous avons pu observer des foci de fluorescence aux pôles des bactéries. Les foci sont pour la majorité par paire : un à chaque pôle de la cellule (**Figure 60I et 60J**). En phase stationnaire à 30°C, nous observons une fluorescence diffuse (**Figure 62H**). Nous ne savons pas encore si ces foyers correspondent à l'assemblage d'un appareil de sécrétion. Dans cette éventualité, alors, l'assemblage du T6SS serait sensible à la température.

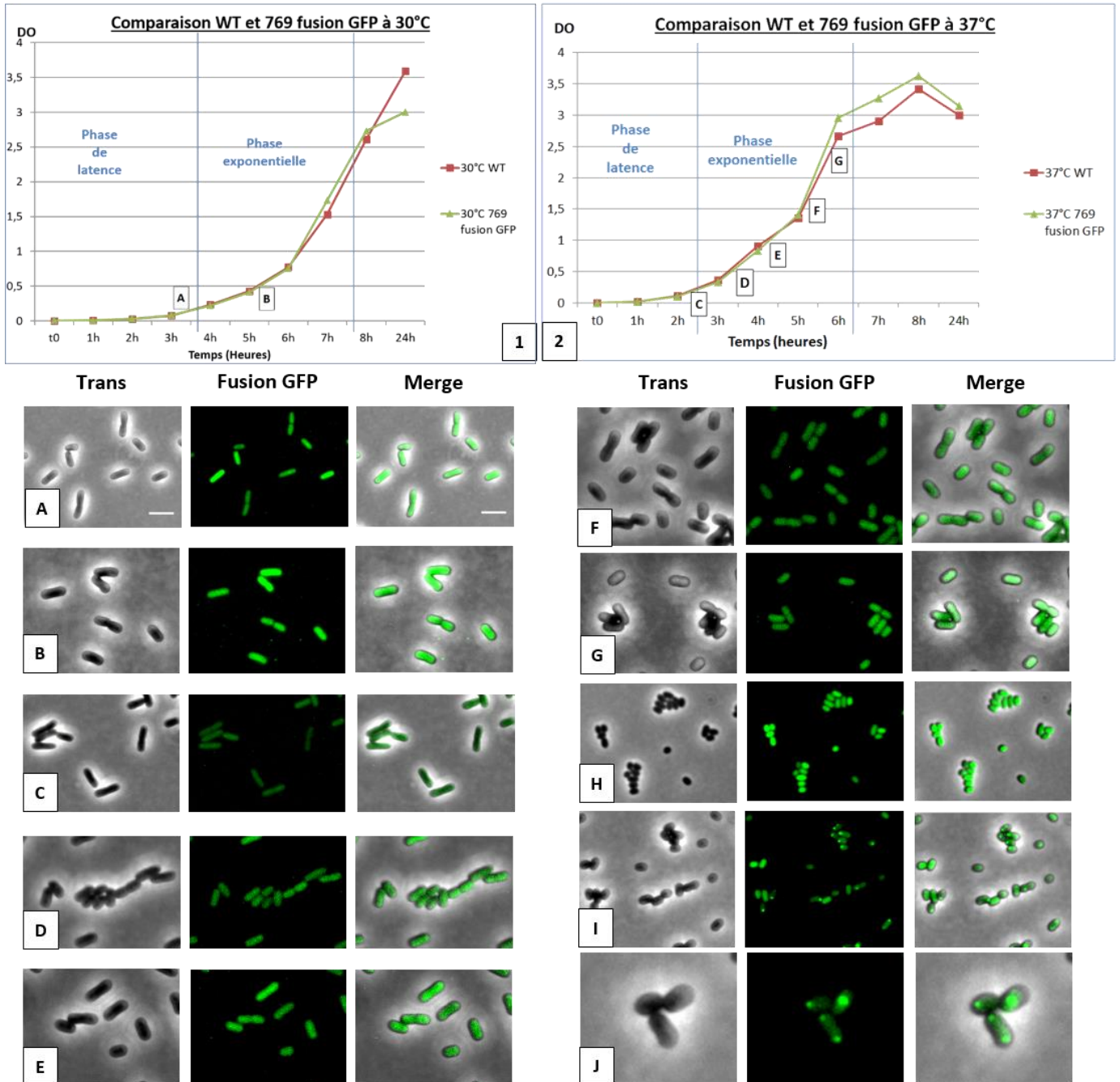


Figure 60 : Acquisition d'images par microscopie des cultures de LF82_769-GFP poussant à 30°C ou 37°C sous agitation 180 RPM. (1) Courbe de croissance à 30°C de la souche LF82 WT et de la souche LF82_769-GFP. (2) Courbe de croissance à 37°C de la souche LF82 WT et de la souche LF82_769-GFP. (A) Culture à 30°C DO 0,241 600nm. (B) Culture à 30°C DO 0,473 600 nm. (C) Culture à 37°C DO 0,274 600nm. (D) Culture à 37°C DO 0,470 600 nm. (E) Culture à 37°C DO 0,731 600 nm. (F) Culture à 37°C DO 1,5 600nm. (G) Culture à 37°C DO 2,3 600nm. (H) Culture ON (Over Night) 30°C. (I) Culture ON 37°C. (L) Zoom sur la culture ON à 37°C. Echelle : 10 µm

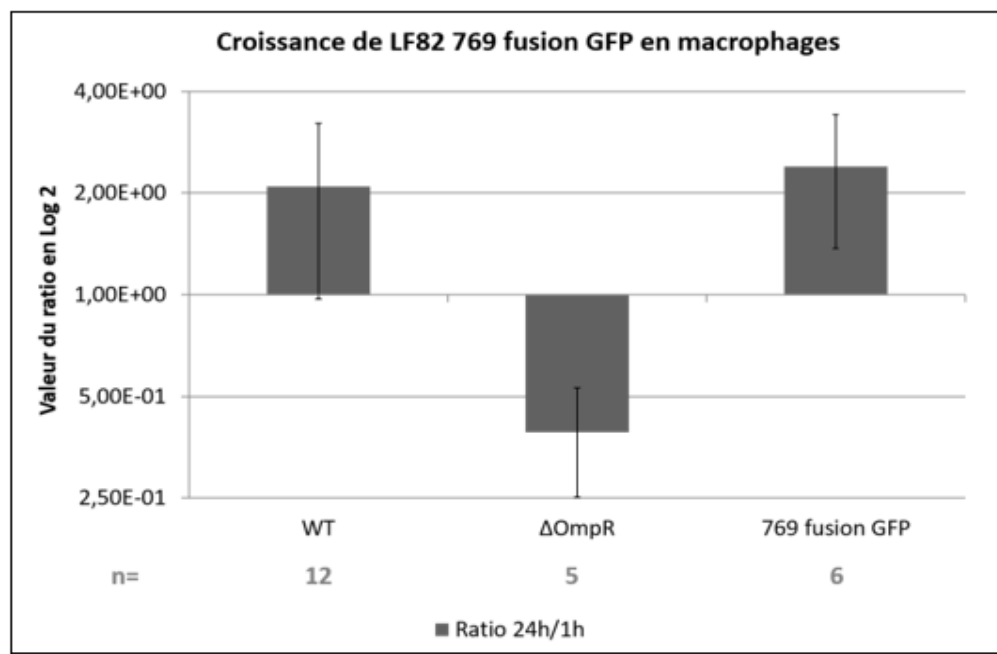


Figure 61 : Représentation graphique du ratio des CFU 24h/1h PI de la souche LF82_769-GFP en macrophages murins RAW 264.7. Le log2 du ratio est représenté. .

L'infection des macrophages RAW avec la souche LF82_769-GFP HU mCherry a ensuite été réalisée afin d'évaluer la formation de foci et de visualiser à quel stade de l'infection le gène LF82_769 est exprimé (**Figure 62**). 1h après infection, les bactéries présentent 2 foci fluorescents aux pôles de la cellule comme nous avons pu observer *in vitro* en phase stationnaire (**Figure 62A**). A 6h PI, des foci caractéristiques sont aussi visibles sur plusieurs bactéries (**Figure 62B**). A 24h PI, certaines bactéries ont formées des IBC (**Figure 62C**) tandis que d'autres bactéries sont isolées (**Figure 62D**). Dans les 2 cas des structures de LF82_769-GFP sont observables aux pôles des cellules. D'après ces images, il semblerait qu'une structure impliquant LF82_769-GFP se forme dans certaines bactéries tout au long de l'infection.

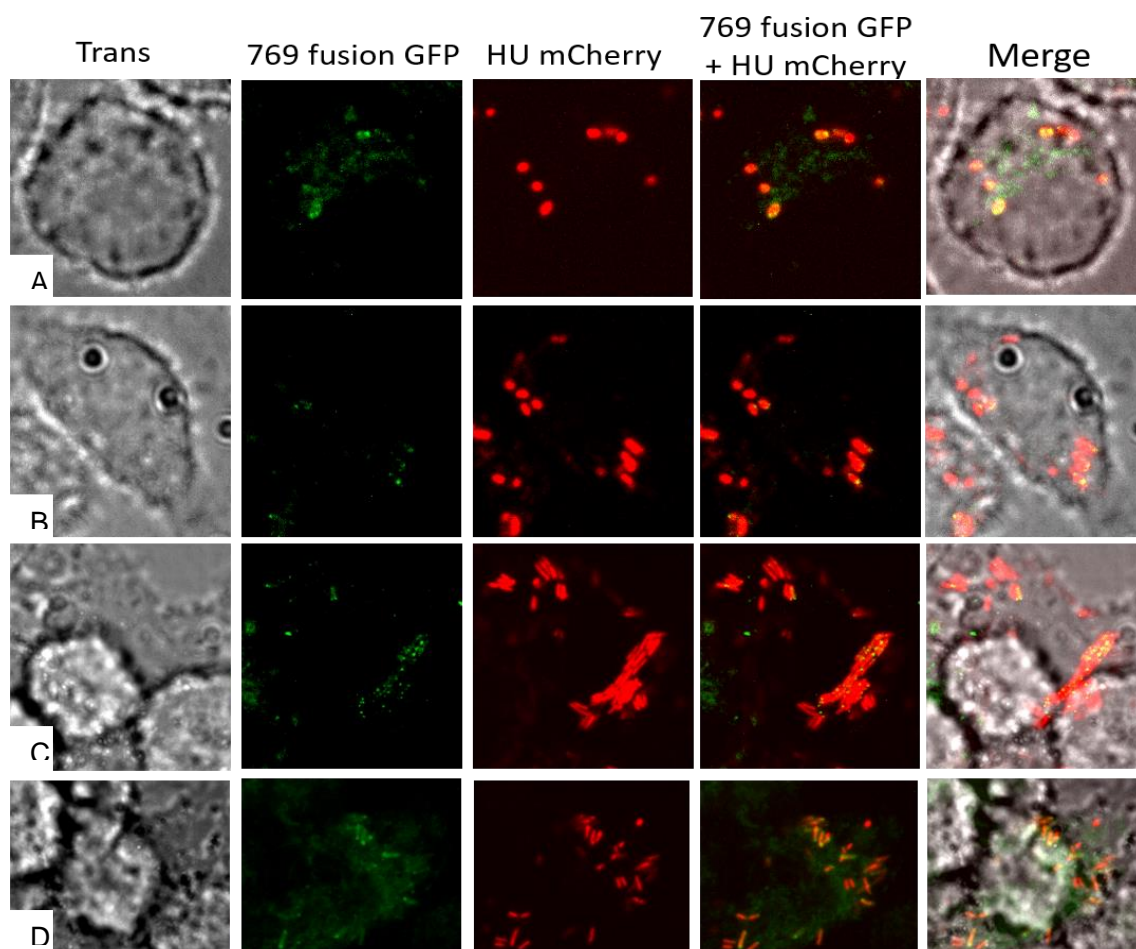


Figure 62 : Acquisition d'image de macrophages murins RAW 264.7 infectés par LF82_769-GFP HU mCherry MOI 50 fixés 1h et 24h post infection. (A) 1h PI. (B) 6h PI. (C) Foyers multiplicatifs à 24h PI. (D) Bactéries isolées à 24h PI. Echelle : 10 μ m

4-Compétition *in vitro* entre les souches E. coli C600 GFP et LF82 RPSM mCherry

Les systèmes de sécrétion de type VI ont été décrit dans la littérature comme un outil de défense de certaines souches bactériennes permettant d'injecter une toxine dans les souches étrangères l'environnant. Nous avons donc voulu mettre en place une expérience de compétition entre la souche *E. coli* C600 et LF82 WT. Pour cela, nous avons utilisé ces souches chacune dotée d'un rapporteur fluorescent différent. Notre objectif est de déterminer si la souche C600 est éliminée en étant mise au contact avec LF82 qui possède plusieurs T6SS. Nous

les avons donc concentrées et mélangées sur un pad agarose de milieu minimum. Nous avons choisi ce milieu pour déclencher la compétition pour les nutriments entre les deux souches.

L'expérience de compétition nous permet de voir une bactérie C600 verte s'allongeant au contact d'une bactérie LF82 rouge désignée par une flèche blanche (**Figure 63**). Sur les images prise de 260 à 300 min, on peut voir cette bactérie disparaître. Nous avons observé un faible nombre d'événements semblables sur le reste du champ. On peut supposer que cette mort soudaine peut être due au contact avec LF82. De plus, le contact avec LF82 se fait à son pôle, là où nous avons localisé la structure d'un potentiel T6SS. Malheureusement la rareté de ces événements ne nous a pas permis d'envisager l'analyse des mutants des 3 T6SS codés par le génome de LF82. Ces travaux, restent à compléter, mais ouvrent la voie vers un autre aspect de l'adaptation de LF82 à son environnement.

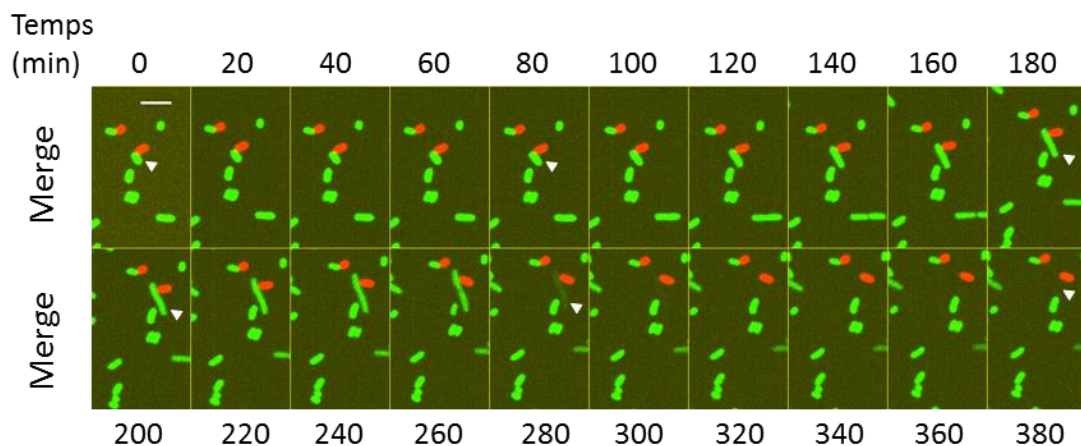


Figure 63: Time laps de la compétition entre LF82 RPSM mCherry et C600 GFP. Les prises de vue sont espacées de 20 min. Le champ complet présente 1200 bactéries C600 et 200 bactéries LF82. Cette prise de vue isolée représente un évènement de disparition d'une bactérie C600 au contact d'une bactérie LF82 désigné par les flèches blanches. Echelle : 10 μ m.

Discussion

La maladie de Crohn (MC) est un trouble inflammatoire qui peut affecter n'importe quel segment du tractus gastro-intestinal de la bouche à l'anus. La MC se caractérise par des périodes de rechute lorsque les gens éprouvent des symptômes et des périodes de rémission lorsque les symptômes cessent. Malgré des données convaincantes indiquant le rôle crucial de la microflore intestinale dans la pathogenèse des maladies inflammatoires de l'intestin (MICI), l'utilisation d'antibiotiques dans la pratique clinique demeure limitée, en grande partie en raison d'essais hétérogènes et de données souvent contradictoires. La MC est caractérisée par une modification de la composition des bactéries commensales intestinales (dysbiose). On considère que la dysbiose joue un rôle prééminent dans la pathogenèse de la MC en induisant une réponse immunitaire anormale chez les personnes génétiquement sensibles. Les patients atteints de la MC présentent une composition modifiée du microbiote intestinal avec des concentrations accrues de bactéries envahissantes, en particulier *Escherichia coli* (*E. coli*) et une diminution du nombre de bifidobactéries, lactobacilles et *Faecalibacterium prausnitzii*, qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires. Parmi les protéobactéries qui colonisent l'intestin des patients atteints de la MC, une nouvelle famille de bactéries *E. coli* a été identifiée : les *E. coli* adhérentes et invasives (AIEC). Les AIEC peuvent envahir les macrophages et s'y répliquer, induisant la sécrétion de grandes quantités de $\text{TNF}\alpha$, amplifiant la réponse inflammatoire, ce qui est une caractéristique de la MC. Ces caractéristiques distinguent les AIEC de la plupart des *E. coli* qui sont des pathogènes extracellulaires.

Durant ma thèse je me suis intéressée particulièrement à la caractérisation de l'adaptation d'une AIEC, LF82, à la survie et à la croissance dans les macrophages. LF82 réside à l'intérieur des phagolysosomes matures qui fournissent un environnement stressant (pH acide, stress oxydatif, privation de nutriments, etc.). Cet environnement est la plupart du temps mortel pour les bactéries ou limite très drastiquement leur croissance. Les bactéries pathogènes intracellulaires ont développé de nombreuses stratégies pour détourner ou détoxifier le trafic phagosomal, rendant ainsi la vacuole plus accueillante pour leur multiplication. La croissance de la bactérie LF82 dans un phagolysosome mature fait exception parmi les bactéries intracellulaires.

Adaptation de LF82 à l'environnement hostile des macrophages.

Durant la première partie de ma thèse, mes travaux combinés à ceux de Gaëlle Demarre ont permis de caractériser l'adaptation de LF82 à l'environnement hostile du macrophage. Nous avons observé qu'après infection, LF82 entre dans une phase de latence qui dure près de 10h, ensuite certaines bactéries recommencent à se multiplier pour créer éventuellement des *foci* réplicatifs que j'appellerai plus tard communautés bactériennes intracellulaires (IBC) (**Figure 64**). Nous avons montré que la réponse stringente (le point de contrôle bactérien impliqué dans la réponse à une limitation des nutriments) et la réponse SOS (la voie bactérienne impliquée dans la réparation de l'ADN) sont critiques pour la survie et la multiplication de LF82 dans les macrophages. L'induction de ces deux réponses au stress a pour conséquence directe de créer une hétérogénéité dans la population bactérienne avec des bactéries répliquatives qui contribuent à augmenter la taille de la population, mais avec un taux de mortalité élevé et des bactéries non répliquatives qui elles tolèrent facilement le stress. Nous avons observé que la population non répliquative tolère également les antibiotiques lorsqu'elle se trouve à l'intérieur d'un macrophage, mais aussi plusieurs heures après la mort du macrophage. Ces bactéries tolérant les antibiotiques sont appelées persistants ou « persisters », elles sont généralement rares dans les populations bactériennes (1/10 000 - 1/100 000), alors que nous en observons jusqu'à 10% de la population de LF82 dans les macrophages. Nos résultats suggèrent donc que la quantité de bactéries LF82 présentes 24h post infection dépend de nombreux paramètres ; la capacité à résister aux stress initiaux imposés par le macrophage, la capacité à résister aux stress grandissants avec l'augmentation de la population bactérienne, la capacité à sortir de la phase de latence imposée par la réponse stringente en début d'infection, la capacité à se multiplier et enfin du nombre de bactéries non répliquatives formées à chacune de ces étapes. Pour mieux comprendre l'impact de l'expression de certains gènes sur chacun de ces paramètres, nous avons initié une collaboration avec Hanna Schenk et Silvia De Monte (ENS-Paris) qui ont mis en place un modèle mathématique d'analyse quantitative de la croissance de LF82 dans les macrophages. Les paramètres de croissance, de mort et de persistance de la population du modèle ont été déterminés à partir de nos expériences, mais ils peuvent être modifiés à souhait ce qui permet de tester *in silico* l'impact de leur altération et ainsi de

mieux comprendre, et peut être prédire, l'influence de mutants. Ces résultats sont décrits dans l'article *The Crohn's disease-associated Escherichia coli strain LF82 rely on SOS and stringent responses to survive, multiply and tolerate antibiotics within* - PLoS Pathogens.

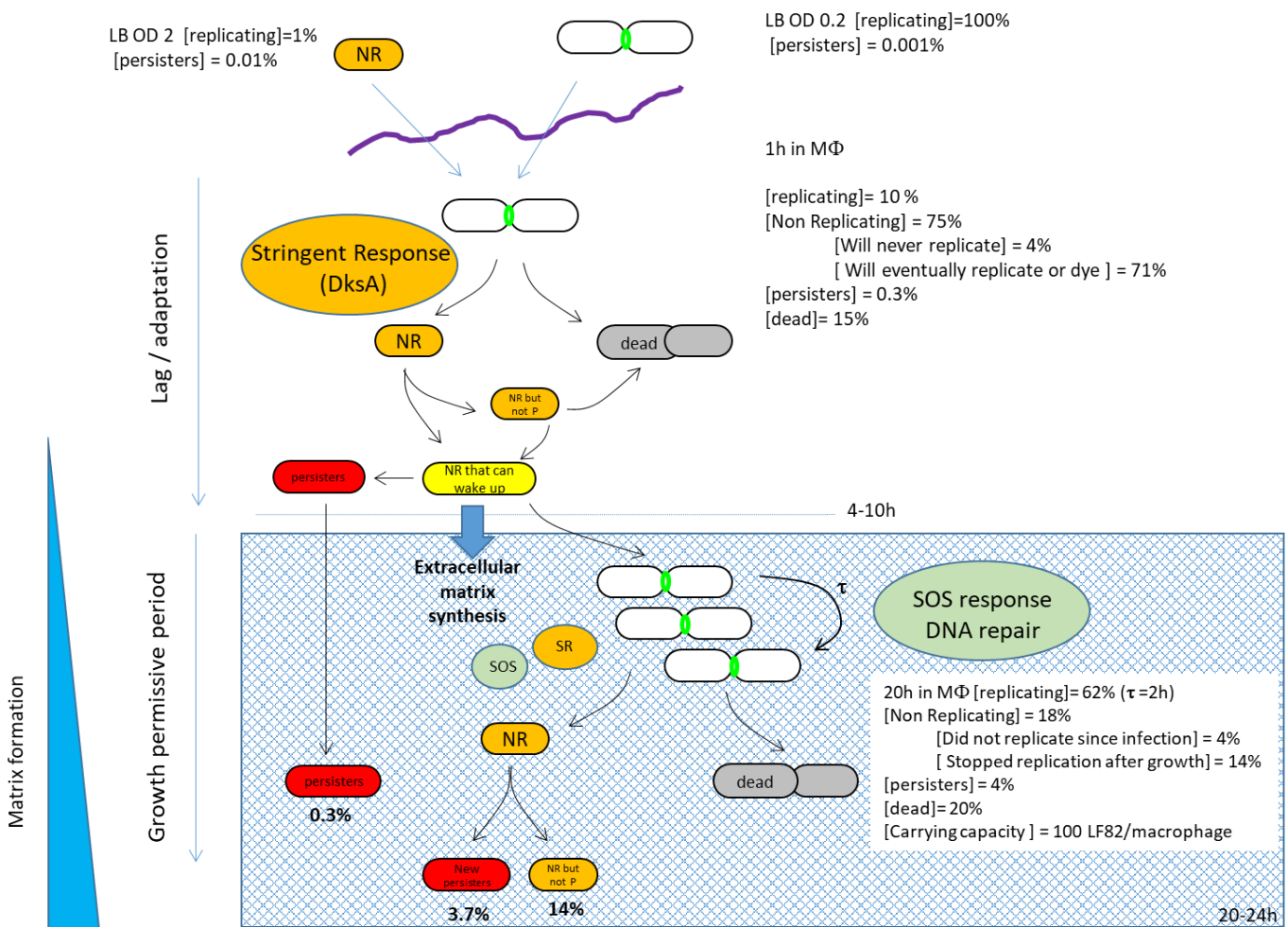


Figure 64- Modèle de l'adaptation de la bactérie LF82 dans les macrophages

Les bactéries en persistance lors de l'infection.

Un aspect important de ces résultats est l'observation qu'une grande partie de la population LF82 (de 0,3 à 10 %) est tolérante à plusieurs heures de traitement antibiotique, et que la proportion de bactéries non répliquatives dans la population augmente dans les macrophages en présence des antibiotiques. Ces observations suggèrent que l'environnement phagolysosomal induit des arrêts fréquents du cycle cellulaire dans la population et qu'une partie de cette population arrêtée est persistante ou tolérante aux antibiotiques. Un tel phénomène a déjà été décrit lors d'une infection à *S. typhimurium* de macrophages de souris et rappelle ce qui est observé chez les mycobactéries VBNR (Fisher, Gollan, et Helaine 2017; Mouton et al. 2016). Fait intéressant, nous avons observé une augmentation de la proportion de LF82 résistante aux antibiotiques induite par les macrophages à des moments tardifs de l'infection, ce qui suggère la possibilité pour une bactérie de passer de l'état répliquatif à non répliquatif et *vice et versa* durant le processus infectieux. Qu'elles soient répliquatives ou non les LF82 présentent des réponses adaptatives au microenvironnement intracellulaire. La tolérance (persistance) aux antibiotiques est un problème en soit, car elle peut provoquer la réémergence lorsque le traitement est arrêté de bactéries qui étaient contenues par l'antibiotique, mais plus dramatique encore la tolérance aux antibiotiques facilite l'évolution de la résistance (Levin-Reisman et al. 2017). De fait, la tolérance précède toujours la résistance, c'est parmi la population de bactéries tolérantes que les mutations ont le temps d'apparaître et d'être sélectionnées ou que les transferts horizontaux entre souches ou espèces se mettent en place (Bakkeren et al. 2019). Mes travaux suggèrent qu'au-delà de la maladie de Crohn les risques sanitaires envisageables sont importants avec des bactéries telles que LF82 ayant 10% de sa population tolérante aux antibiotiques dans les macrophages. Les macrophages d'individus traités aux antibiotiques pourraient être des incubateurs de futures bactéries résistantes à divers antibiotiques. Cela est d'autant plus envisageable dans le contexte de macrophages ayant phagocytés plusieurs espèces de bactéries, ce qui pourrait favoriser les échanges horizontaux de matériel génétique.

La formation de communautés intracellulaire de LF82.

Durant la seconde partie de ma thèse, j'ai cherché à caractériser ce qui permettait à LF82 de se multiplier et de former des IBC dans les macrophages. J'ai mis en évidence la production et la présence d'une matrice apparentée aux biofilms, composés de sucres et de fibres amyloïdes produits par la bactérie dans les phagolysosomes des macrophages. Les expériences de microscopie STED super-résolution montre que chaque bactérie individuelle est entourée par cette matrice. Cette observation a été confirmée par des données génomiques combinant au cours de l'infection des expériences de RNAseq, réalisées en collaboration avec le groupe d'Antonin Morillon (Institut Curie), et de Tnseq. Nous avons observé l'induction des gènes permettant la formation d'un biofilm 6h après le début de l'infection. Les régulateurs de cette cascade sont essentiels à la survie dans le macrophage. Ces observations m'ont permis de choisir un certain nombre de mutants, dont j'ai testé la survie et la capacité à former des IBC dans les macrophages. Les délétions des gènes impliqués dans la régulation de la formation de biofilm et plus directement dans les composants de la matrice extracellulaire affectent la viabilité de la bactérie dans les macrophages et leur capacité à y former des IBC. L'utilisation de l'acide 2 décénoïque, qui perturbe le quorum sensing de nombreuses espèces bactériennes et levures, permet la dispersion des biofilms *in vitro*. En l'utilisant dans les macrophages infectés, j'ai observé une diminution de la quantité de matrice exopolysaccharidique dans les IBC ainsi qu'une réduction de la taille des IBC. Ce résultat confirme que la présence d'une matrice extracellulaire sécrétée par les bactéries à partir de 6h après l'infection permet la formation d'IBC dans certains macrophages infectés.

Ces résultats sont décrits dans l'article ***Crohn's disease related bacterium AIEC LF82 assembles a biofilm like matrix to protect intracellular microcolonies from phagolysosomes attacks*** soumis pour publication.

Quel est le rôle de la matrice extracellulaire ?

La haute tolérance aux stress de la vacuole d'infection pourrait être due à la combinaison des deux mécanismes : persistance et production de matrice extracellulaire. Ce qui protégerait les bactéries qui se multiplient et fourniraient un réservoir de bactéries non

réplicatives pour tolérer un excès de stress. Toutefois, j'ai observé que les bactéries des IBC exprimaient fréquemment les biosensors de réponse aux stress (Article PLoS Pathogens et données non montrées), l'IBC n'est donc pas une zone du phagolysosomes où les stress acides, oxydatifs et génotoxiques sont gommés (**Figure 65**). Une croissance lente laisse le temps aux bactéries de réparer les possibles lésions à l'ADN et de produire la matrice extracellulaire pour ensuite augmenter son temps de génération sous la protection du biofilm.

La mutation de gènes impliqués dans la formation de biofilms, celui du régulateur CsgD par exemple, affecte significativement le nombre de persisters formé au cours de l'infection. Cela suggère que la formation de persisters est liée à celle du biofilm durant l'infection.

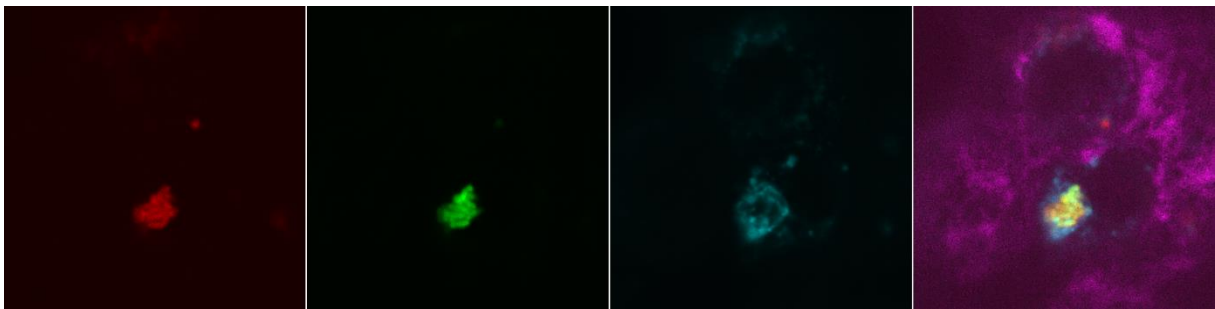


Figure 65- Expression du rapporteur de stress acide p1485-GFP (vert) par la bactérie LF82 (rouge) - 24h post infection dans les phagolysosomes (bleu) des macrophages (violet).

Le rôle de l'acide dans la signalisation de l'infection.

Les résultats de RNAseq et de biosensors montrent que la réponse de LF82 à l'acidification de son environnement est massive et immédiate après la phagocytose. L'acidification pourrait donc être utilisée comme signal pour enclencher l'adaptation de LF82. La formation de biofilm offre une protection contre un large éventail de stress environnementaux, dont l'acidification du milieu (Senneby et al. 2017). Chez *Streptococcus mutans*, par exemple, comme pour LF82, le pH de la niche écologique exerce une pression sélective importante. La capacité de *S. mutans* à coloniser la plaque dentaire dépend de sa capacité à tolérer et croître dans des environnements contenant des pH acides. *S. mutans* s'organise en biofilm dans son écosystème naturel. La formation du biofilm est enclenchée par une densité cellulaire élevée il y a alors induction d'un système de signalisation *via* une phéromone qui contrôle l'adaptation et la tolérance à un pH acide (McNeill et Hamilton 2003). La dispersion du biofilm réduit la tolérance à l'acide et la réponse physiologique au stress acide.

Chez LF82, comme la matrice exopolysaccharide apparaît dans des phagolysosomes ne contenant que quelques bactéries, la densité bactérienne ne semble pas être le déclencheur de la transition vers le biofilm. Nous avons donc considéré que l'acidification de la vacuole pouvait être responsable de l'induction des gènes responsables de la synthèse de la matrice. Nos tests *in vitro* en pH acide n'ont pas montré d'amélioration de la formation de biofilm (résultats non montrés). L'acide ne serait donc pas le signal déclencheur du phénotype biofilm, mais je ne peux pas exclure que la formation de biofilm par la bactérie LF82 pourrait permettre comme chez *S. mutans* une résistance à ce stress lors de l'infection.

Chez *Salmonella enterica* et *Listeria monocytogenes*, le stress acide agit comme un signal permettant le déclenchement de la sécrétion d'effecteurs permettant respectivement le détournement du trafic vésiculaire ou la lyse de la vacuole. Le cytoplasme de *S. typhimurium* s'acidifie de façon dépendante du système de transduction de signal EnvZ-OmpR (capteur du stress osmotique régulant notamment l'expression de porines de la membrane externe), permettant l'activation de facteurs de virulence comme les systèmes de sécrétion de type III (Chakraborty, Mizusaki, et Kenney 2015). Des résultats obtenus en collaboration avec l'équipe de Maude Guiller montrent l'importance d'OmpR chez LF82 lors de l'infection des macrophages, la viabilité est drastiquement affectée chez un mutant pour ce gène. Nous pourrions compléter nos résultats préliminaires en mesurant le pH cytoplasmique *in vitro* de

LF82 et tester si les gènes *enZ-ompR* sont absolument nécessaires à cette acidification du cytoplasme. Un mécanisme similaire à *S. typhimurium* pourrait se produire chez LF82 dans le déclenchement de sécrétions d'effecteurs de virulence en réponse au stress acide présent lors de la maturation du phagosome et tout au long de l'infection (les vacuoles sont acides en permanence - résultats non montrés). Le biofilm permettrait ensuite la résistance à ce stress, rendant inutile la détoxification de la vacuole ou la modulation du trafic intracellulaire.

L'acidification du milieu pourrait également être un des facteurs déclenchant la présence de bactéries non-répliquatives et tolérantes aux antibiotiques. Les travaux de Gaëlle Demarre ont démontré qu'*in vitro* un stress acide ne suffisait pas à augmenter le nombre de persisters dans une population de LF82. Toutefois, en combinant l'acidification avec un autre stress comme la réponse stringente ou la chélation des ions Mg^{2+} par de l'EDTA le nombre de persisters augmente très fortement. La signalisation vers l'état de « dormance » pourrait donc impliquer l'acidification de la vacuole si elle est couplée à un autre stress.

Les contraintes mécaniques de la vacuole seraient favorables à la formation de biofilms intravacuolaires ?

Un stress mécanique lié au confinement spatial des bactéries peut provoquer la formation de biofilm (Chu et al. 2018; Grant et al. 2014). C'est ce qui a été démontré en faisant croître une colonie d'*E. coli* uropathogène (UPEC) dans un hydrogel (environnement confiné ressemblant à une vacuole). En réponse à l'apparition progressive du stress mécanique dû à la compression de l'hydrogel (confinement spatialement uniforme) sur la colonie, les bactéries expriment des facteurs de réponse aux stress dès le début de la formation de la colonie et tout au long de la croissance et déclenchent la production d'une matrice extracellulaire dans l'ensemble de la colonie. Cette réponse aux stress continus et homogènes permet à la colonie de réagir plus rapidement et avec une meilleure sensibilité aux changements environnementaux (Chu et al. 2018). Lors de la colonisation des cellules épithéliales de la vessie, les UPEC sont structurés comme des biofilms, ils expriment de nombreux composants de la matrice extracellulaire comprenant des exopolysaccharides et

des fibres protéiques tels que les curli. Les UPEC se multiplient très rapidement dans les premiers temps de l'infection avec un temps de doublement moyen de 30 min et peuvent assez tôt dans leur cycle infectieux rencontrer une résistance mécanique venant de la membrane de la cellule épithéliale. Le développement de biofilms pourrait être une conséquence directe de l'évolution des contraintes mécaniques appliquées par la cellule hôte au cours de l'infection. Ces observations suggèrent que le confinement physique d'une colonie en expansion et la résistance mécanique de l'environnement à la croissance de la colonie peuvent être des facteurs importants pour déclencher le développement du biofilm. Dans les régions à forte prolifération cellulaire, le stress mécanique augmente en suivant la division cellulaire. Il est intéressant de noter que lors de mes observations avec LF82 de vacuoles marquées par Lamp1, je n'ai jamais observé de vacuoles lâches autour des bactéries, la taille de la vacuole semble toujours être exactement ajustée à la quantité de bactéries. La pression imposée par la membrane vacuolaire serait donc à peu près constante lors de l'infection. Lors de l'infection des macrophages par LF82, les vacuoles au sein d'une même cellule contenant les bactéries fusionnent au cours du temps pour former un seul et unique phagolysosome (Figure 1 de l'article 2). Lors de la fusion de nombreux paramètres des vacuoles peuvent changer et peut être que la pression peut augmenter, ceci pourrait aussi être utilisé par LF82 pour induire des réponses au stress et la formation du biofilm. Le stress mécanique peut-il impacter d'autres paramètres physiologiques des bactéries ?

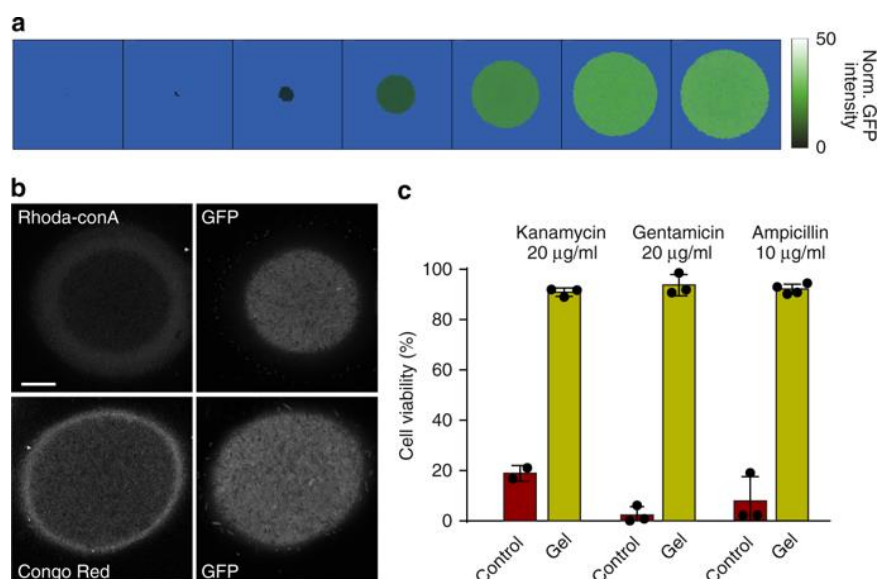


Figure 66-Croissance de biofilms dans un environnement à résistance mécanique. Développement d'une colonie dans un hydrogel. **a** - L'échelle de couleur verte

code le niveau de réponse au stress. **b** Distributions spatiales des bactéries *E. coli* (JM105) (GFP) et des biofilms signalant des contraintes dans des colonies cultivées dans un hydrogel à 1% de PuraMatrix.. Marquage des biofilms à la concanavaleine A et la rhodamine et le curli coloré au rouge Congo après environ 6 h de croissance. Barre d'échelle, 20 μm . **c** - Comparaison de la viabilité entre une culture planctonique et une culture ayant poussée durant 6 h en hydrogel après exposition à 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de kanamycine (JM105) ($n = 2$ pour le témoin, $n = 3$ pour le gel), 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de gentamicine (CFT073) ($n = 3$) et 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ d'ampicilline (CFT073) ($n = 3$ pour le contrôle, $n = 4$ pour le gel).

Quorum sensing et biofilm multi espèces.

La formation de biofilm est régulée par la sécrétion dans le milieu d'auto-inducteurs s'accumulant avec l'augmentation du nombre de cellules environnantes. Ce mécanisme appelé quorum sensing permet de coordonner l'activité d'une communauté vers un même objectif. La mobilité dépendant du flagelle a longtemps été associée à la formation de biofilm, mais les bactéries peuvent également utiliser la chimiotaxie pour s'associer entre elles sur une surface et former ensuite un quorum. Les bactéries peuvent s'accumuler au sein d'une enceinte en suivant la sécrétion d'acides aminés comme la glycine ou la sérine qui sont des chimioattractants (S. Park et al. 2003). Des expériences dans des labyrinthes montrent le regroupement des bactéries dans des endroits confinés leur permettant d'obtenir une densité cellulaire élevée suffisante pour enclencher le quorum sensing. La fusion des vacuoles LF82 dans le macrophage pourrait permettre d'augmenter la densité cellulaire dans les vacuoles et encourager le phénomène de quorum sensing déclenchant la formation de biofilm.

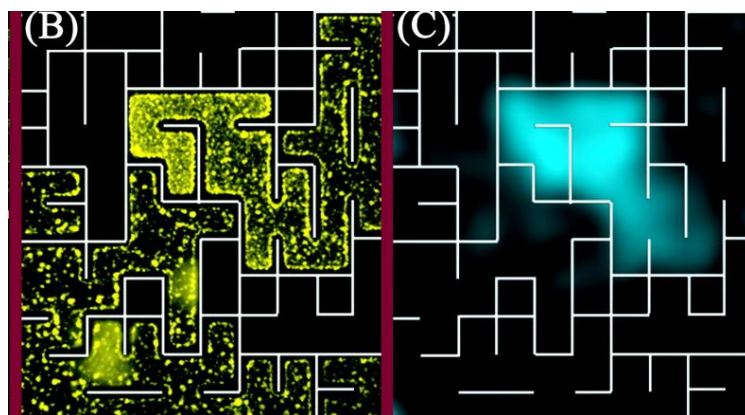


Figure 67-Accumulation d'*E. coli* et *V. harveyi* et détection du quorum. (B) Image de *V. harveyi* après 8 heures dans le labyrinthe. Les passages les plus étroits ont une largeur de 100 μm . Les lignes correspondant aux parois du labyrinthe sont superposées pour plus de

clarté. (C) Image de comptage de photons de la luminescence intrinsèque, indiquant la détection du quorum actif dans les zones où les cellules se sont accumulées à haute densité.

J'ai réalisé des expériences de co-infections avec des LF82 et des bactéries *E. coli* K12 non pathogènes ne formant pas de matrice exopolysaccharidique dans les phagolysosomes ; elles ont montré que *E. coli* K12 peut bénéficier de la matrice produite par LF82 lors de l'infection. Ce phénomène pourrait contribuer à la protection de bactéries non pathogènes et ainsi augmenter leur nombre. En effet dans le contexte de la maladie de Crohn les protéobactéries qui bénéficient de la dysbiose ne sont pas toutes des pathogènes ou des pathobiontes. Certaines molécules du quorum sensing pour la formation de biofilm sont inter-espèces, la production de biofilm et la composition de la matrice pourraient être renforcées par la présence d'une autre espèce.

Pour visualiser ces effets de communication entre différentes bactéries résidentes d'une même vacuole dans les macrophages au cours de l'infection, on pourrait réitérer des expériences de co-infection en utilisant cette fois-ci un rapporteur de l'activité métabolique dans la souche *E. coli* non pathogènes. J'ai construit durant ma thèse un rapporteur GFP de l'expression des ATP synthase qui témoignent de l'activité métabolique. Ce rapporteur pourrait permettre de visualiser si la présence de LF82 augmente le métabolisme de souches d'*E. coli* non pathogène lorsqu'elles sont protégées par la matrice et stimulées par le quorum sensing.

Importance du recrutement du fer dans la multiplication de LF82 dans les macrophages.

Le fer est important en tant que nutriment essentiel pour la survie et la multiplication des micro-organismes. Il intervient dans tous les mécanismes essentiels en tant que composant d'enzymes, de protéines régulatrices, de complexes métaboliques jouant un rôle dans la signalisation et le métabolisme. Le fer peut également réagir avec l' H_2O_2 lors de la réaction de Fenton pour former des radicaux hydroxyles toxiques pouvant altérer les protéines, l'ADN et les lipides de bactéries. Les bactéries ont donc développé différents systèmes, décrits en

introduction, pour maintenir l'homéostasie du fer. La concentration en fer joue également un rôle important dans la formation de biofilm par les bactéries et affecte leur formation (Saha et al. 2013). Chez *P.aeruginosa* le fer sert de signal environnemental pour la formation de biofilm (Banin, Vasil, et Greenberg 2005). Pendant l'infection des macrophages LF82 présente une forte induction de l'îlot de pathogénicité responsable de la synthèse de la yersiniabactine, un sidérophore. Cette expression est coordonnée avec la mise en place de la matrice de biofilm. La yersiniabactine renforce la pathogénicité de *Yersinia*. Cet îlot appelé HIP est fréquemment présent dans les génomes d'entérobactéries, 80% des souches ExPEC en possèdent (Bach, de Almeida, et Carniel 2000) notamment les UPEC (Henderson et al. 2009). La yersiniabactine est capable de fixer le fer, mais aussi le cuivre et le nickel (Robinson et al. 2018). Nous avons observé la répression de tous les autres systèmes d'acquisition et d'absorption du fer au cours de l'infection. Ce qui suggère qu'une fois dans le macrophage LF82 se repose essentiellement sur la yersiniabactine pour acquérir le fer. Les bactéries pathogènes doivent échapper aux défenses mises en jeu par l'hôte qui affecte la capture du fer. Par exemple la protéine associée à l'inflammation, lipocaline 2, à la capacité de se lier au sidérophore entérobactine le rendant inactif (Goetz et al. 2002). Les sidérophores acquis par transferts horizontaux comme salmochéline, yersiniabactine et aérobactine ne se lient pas à cette protéine et sont qualifiés de sidérophores furtifs. Il est également à noter que l'utilisation de sidérophores dont le pH optimum de fixation du fer varie permet aux bactéries pathogènes de s'adapter à différents environnements. La répression chez LF82 des autres systèmes d'acquisition et d'absorption du fer au cours de l'infection pourrait être due au fait que la yersiniabactine est un meilleur chelateur de fer dans un environnement avec un pH acide où la protonation diminue l'affinité pour les ions ferriques des sidérophores de catécholate (comme l'enterobactine) (voir figure 20, introduction) (Valdebenito et al. 2006; Abergel et al. 2006). L'induction de la yersiniabactine chez LF82 est dépendante de CsgD, ce qui suggère un lien entre la formation de la matrice extracellulaire et la capture du fer. Il est intéressant de noter que l'induction du système bactérien Yersiniabactine a été observée pendant la maturation du biofilm de la souche *E. coli* UTI dans de l'urine. La formation de biofilms est fortement réduite dans les souches d'infections urinaires dépourvues du gène *fyuA*, présent dans le HIP, codant pour le récepteur de l'holo-yersiniabactine. Nous avons observé un phénotype similaire *ex vivo* avec LF82 où l'îlot de pathogénicité 2 (HIP) est délété et on observe une réduction significative de la coloration WGA des exopolysaccharides sur

les IBC. Ces observations suggèrent une relation synergique entre la formation de communauté intracellulaire similaire au biofilm et la capture du fer par la yersiniabactine.

Le Fer et le cuivre deviennent bactéricide quand ils sont en présence d'oxygène, ils génèrent des espèces réactives à l'oxygène pouvant diffuser dans les bactéries et altérer les clusters fer-soufre (Macomber et Imlay 2009). Le rôle de la yersiniabactine pourrait être aussi de protéger les bactéries. La yersiniabactine empêche la réduction cuivre (II) en cuivre (I) et pourrait ainsi protéger les bactéries pathogènes durant l'infection. D'un autre côté, une carence en cuivre affecte l'activité bactéricide des macrophages et des neutrophiles. Le cuivre est importé dans les compartiments phagosomal *via* la pompe ATP7A (White et al. 2009b). Dans le cas d'une inflammation chronique, la concentration en cuivre augmente extensivement (el Hawy et al. 1993). La yersiniabactine sécrétée durant l'infection des macrophages par LF82 pourrait donc être multifonctionnelle en favorisant la formation de biofilm en protégeant la bactérie vis-à-vis des ROS et en réduisant l'activité du macrophage.

UPEC-AIEC des mécanismes de pathogénicité similaires.

La comparaison des génomes a montré un lien étroit entre les AIEC et les *E. coli* pathogènes extra intestinaux (ExPEC) notamment les UPEC (John HE Nash et al. 2010). La différence entre les deux pathovars pourrait provenir d'une évolution différentielle acquise dans l'environnement pro-inflammatoire de la MC (Martinez-Medina, Mora, et al. 2009). Les souches AIEC partagent des similitudes avec les UPEC dans leurs profils de gènes de virulence et leurs origines phylogénétiques. Les UPEC forment aussi des biofilms intracellulaires et codent très souvent pour l'îlot de pathogénicité de synthèse de la yersiniabactine. De plus les UPEC peuvent survivre dans certains macrophages et les AIEC peuvent également adhérer aux cellules de la vessie (Dreux et al. 2013). Toutefois une différence importante est que lors de l'infection les UPEC se libèrent de la vacuole d'endocytose pour se multiplier dans le cytoplasme. Les cellules épithéliales de l'hôte se détachent de l'épithélium de la vessie pour être éliminées. C'est une stratégie efficace, mais qui expose les couches plus profondes de l'épithélium ce qui est propice à la création de foyers de bactéries. Dans ces cellules internes de la vessie, les bactéries adoptent un cycle

d'infection quiescent, ne se libèrent pas dans le cytoplasme et restent dans une vacuole liée à l'autophagie présentant les marqueurs LAMP1, ATG16L1 et LC3, qui, elle, ressemble aux vacuoles contenant les AIEC. Les UPEC utilisent alors une protéine de la voie de recyclage endocytaire (Rab35) pour obtenir du fer lors de l'infection de ces cellules épithéliales (Dikshit et al. 2015). Le détournement du trafic intra vacuolaire est une stratégie fréquente chez les pathogènes intracellulaire comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *A.phagocytophilum* (Halaas et al. 2010; Huang et al. 2010; Kyei et al. 2006). Cette question du détournement ou de la modification du trafic par LF82 lors des infections des macrophages a été abordée durant ma thèse. J'ai émis l'hypothèse d'un détournement du trafic autophagique à différents stades de l'infection pouvant contribuer à fournir les nutriments nécessaires à la multiplication de LF82. Malheureusement aucun des marqueurs utilisés ne s'est retrouvé sur les vacuoles contenant LF82 (résultats non montrés). L'exploration des protéines Rab reste une hypothèse intéressante à exploiter. Un marquage des protéines Rab au cours de l'infection et l'utilisation d'une lignée déficiente pour certains Rab pour visualiser un éventuel recrutement des endosomes sont des expériences facilement envisageables.

Implication d'un appareil de sécrétion de type VI putatif dans l'infection des macrophages par LF82.

Les systèmes de sécrétion de type VI (T6SS) sont largement répandus chez les bactéries Gram négatives, leurs rôles principalement reconnus sont la compétition entre espèces bactériennes et l'interaction avec l'hôte lors d'une infection. Plusieurs T6SS peuvent exister au sein d'une même bactérie comme c'est le cas pour LF82 qui en possède deux, annotés dans les îlots de pathogénicité I et III. La combinaison des expériences de RNA-seq et Tn-seq au cours de l'infection a permis de mettre en évidence un nouvel appareil de sécrétion de type VI putatif chez la souche LF82 (Figure 5A article 2). Ce T6SS putatif est codé par un îlot génétique situé à 1-488-257 pb sur le génome. Les gènes codant pour la gaine et la plaque basale sont clairement identifiés. Il est intéressant de noter que les deux autres T6SS présents sur les îlots de pathogénicité I et III ne semblent pas, eux, participer à l'infection des

macrophages. Ils ne sont ni surexprimés ni contre sélectionnés dans l'expérience de Tn-seq. L'existence de plusieurs T6SS sur le génome de LF82 laisse supposer plusieurs fonctions différentes, certaines éventuellement impliquées dans l'infection. Les résultats préliminaires obtenus confirment l'importance de ce nouveau T6SS putatif au cours de l'infection des macrophages. Les expériences de fusions GFP montrent l'expression de la structure *in vitro* à 37°C sur une culture en phase stationnaire et *ex vivo* tout au long de l'infection. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour comprendre son rôle dans l'infection. Les hypothèses sont nombreuses, mais nous sommes particulièrement intéressés par la possibilité que ce système participe à l'homéostasie du fer. Les T6SS peuvent intervenir dans la captation de nutriments essentiels comme le fer. Chez *P. aeruginosa*, il existe trois T6SS H1, H2 et H3. Le facteur TseF sécrété par H3-T6SS joue un rôle dans l'absorption du fer en interagissant avec les vésicules de la membrane externe (OMV)(Lin et al. 2017) (**Figure 68**). L'absorption du fer pourrait être une fonction redondante pour les T6SS, ce rôle a également été rapporté chez *E. coli*, *Edwardsiella tarda*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* et *Pseudomonas taiwanensis*.

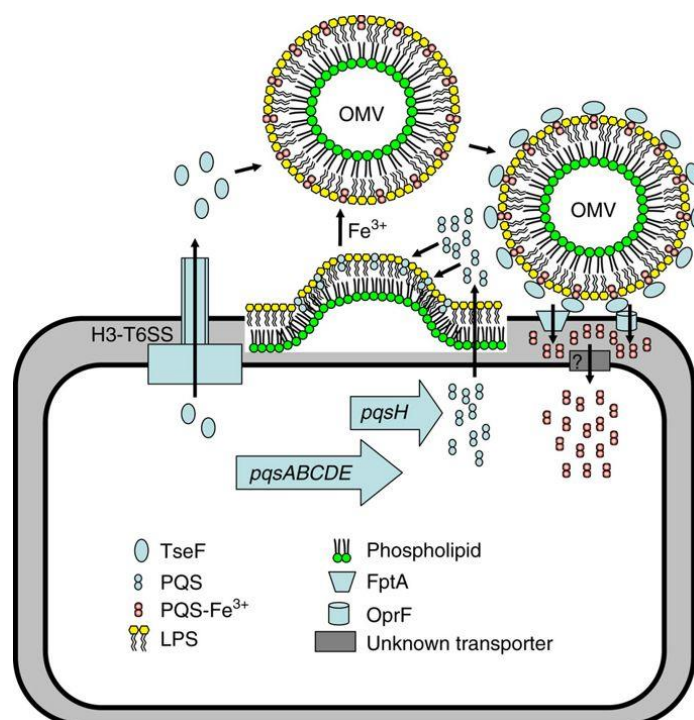


Figure 68-Modèle d'acquisition du Fer chez *P.aeruginosa* par sécrétion du facteur TseF via le complexe OMV. Le facteur TseF est exporté par H3-T6SS, puis incorporé dans les OMV qui permettent le recrutement du fer extracellulaire. Le facteur TseF permettrait une réintégration dans la cellule via des récepteurs spécifiques.

Pour vérifier chez LF82 l'implication de ce nouveau T6SS dans un potentiel rôle de l'acquisition du fer, on peut envisager de regarder s'il est induit par des conditions de carence en fer. On peut également regarder si le régulateur Fur (régulateur de l'absorption ferrique, réprimant les gènes impliqués dans l'acquisition du fer pour maintenir l'homéostasie intracellulaire bactérienne) régule négativement le T6SS putatif en condition non carencée.

Certains T6SS ont été mis en évidence pour leur rôle dans la formation de biofilm ou la résistance aux stress. C'est le cas pour *Yersinia pseudotuberculosis* pour qui le T6SS-4 est impliqué dans la résistance au stress oxydatif en sécrétant une protéine de liaison aux ions métalliques qui importe le zinc pour atténuer les espèces réactives de l'oxygène (T. Wang et al. 2015). C'est un rôle qui pourrait s'avérer particulièrement utile lors de l'infection des macrophages par LF82 pour protéger la bactérie contre les dommages causés par les ROS dans les phagolysosome. L'implication de ce T6SS dans la formation de biofilm au cours de l'infection est également une piste à explorer pour le cas de la souche LF82, le marquage des polymères de la matrice dans les macrophages avec le mutant T6SS ayant montré une diminution de la quantité de matrice extracellulaire (résultats non montrés). Pour tester l'hypothèse de l'implication du T6SS dans la formation de biofilm, des tests *in vitro* en plaques peuvent être facilement mis en place combinés à la quantification de l'expression de Hcp chez les biofilms de LF82 en comparaison à la forme planctonique. On peut également regarder la résistance aux antibiotiques des biofilms formés par la souche sauvage LF82 en comparaison à la souche mutante pour le T6SS. La surexpression du di-GMP-cyclique, du régulateur CsgD ou une carence en nutriment, sur l'activation du T6SS pourrait également éclairer sur son implication dans la formation de biofilm.

Ce nouveau T6SS putatif pourrait également servir à l'injection de protéines effectrices dans le macrophage pour permettre aux bactéries de contrôler leur environnement. On n'en connaît pas encore pour les AIEC, toutefois une étude préliminaire a montré que de nombreuses protéines de LF82 pouvaient se localiser dans des régions particulières (vacuoles d'autophagie, noyau, réticulum endoplasmique) lorsqu'elles sont exprimées directement dans des cellules épithéliales (Collins et Huett 2018). *Vibrio cholerae* libère des toxines responsables de la réticulation de l'actine dans la cellule hôte eucaryote. Chez

Legionella pneumophila Le T6SS est nécessaire pour la multiplication dans les phagosome en inhibant la fusion phagosome-lysosome (Hilbi, Segal, et Shuman 2001). La caractérisation d'effecteurs est difficile, nous pourrions envisager de les co-immunoprécipiter avec les protéines du tube du T6SS (Hcp, VgrG et PAAR). Nous pouvons aussi envisager un crible par microscopie à fluorescence pour chercher les protéines de LF82 sécrétées dans la cellule hôte lors de l'infection. Le système « splitfast » développé par le laboratoire d'Arnaud Gauthier à l'ENS, semble adéquat pour cela (Tebo et Gautier 2019).

Est-ce que les AIEC s'échappent des phagolysosomes ?

La formation de l'IBC, structurée par une matrice extracellulaire, explique que les AIEC ne s'échappent pas des phagolysosomes à l'échelle de temps de nos expériences (24h). La mort des macrophages est inhibée par LF82 tout au long du processus d'infection, cette stratégie peut permettre de laisser le temps au biofilm de se former. Toutefois, nous avons observé sporadiquement qu'à la mort de certains macrophages infectés, l'IBC n'est pas dispersée et est rapidement phagocytée par un macrophage voisin. Ce phénomène permet d'infecter un nouveau macrophage avec une charge bactérienne importante ce qui pourrait augmenter les chances de réussite de la seconde infection. La formation de larges IBC pourrait à l'inverse permettre d'échapper à la phagocytose secondaire et contribuer à la formation de granulome.

A l'issu de ce travail, peut-on envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques ?

L'éclairage nouveau de mes travaux sur la pathogenèse de LF82 dans les macrophages pourrait expliquer en partie l'efficacité controversée des traitements antibiotiques chez les patients atteints de la maladie de Crohn. L'hétérogénéité de la population bactérienne représente un défi majeur pour l'éradication de cette bactérie dans le contexte pathologique. La conception d'une stratégie visant à la fois les biofilms et les cellules en persistance semble essentielle.

Une des stratégies employées pourrait être de bloquer l'accès au fer, indispensable au développement de la bactérie dans les macrophages. La présence de biofilm pourrait également influencer la réponse adaptative du système immunitaire en le bloquant en réponse Th1, favorisant ainsi les infections chroniques. La modification de la réponse Th1/Th2 peut également être envisagée (González, Hahn, et Gunn 2018).

L'éradication des persisters reste un défi majeur et pose d'importants problèmes pour le traitement de nombreuses infections chroniques. Les traitements antibiotiques couramment utilisés pourraient favoriser l'apparition de résistants génétiques dans ces sous-populations de persisters. Actuellement le PZA est le seul antibiotique efficace contre les persisters, son efficacité repose sur le fait qu'il ne cible pas les cellules en multiplication à l'inverse des autres antibiotiques (il est notamment utilisé contre *M.tuberculosis* pour le traitement de la tuberculose). Il est également envisageable d'agir sur le quorum sensing dans le but de disperser le biofilm et le rendre accessible aux antibiotiques, en utilisant ensuite le PZA on pourrait cibler les deux types de population (persisters et biofilms).

Bibliographie

- AbdelRahman, Yasser M., et Robert J. Belland. 2005. « The chlamydial developmental cycle ». *FEMS Microbiology Reviews* 29 (5): 949- 59. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.03.002>.
- Abdullah, Zeinab, Sergej Geiger, Andrea Nino-Castro, Jan P. Böttcher, Eugenia Muraliv, Moritz Gaidt, Frank A. Schildberg, et al. 2012. « Lack of PPAR γ in Myeloid Cells Confers Resistance to *Listeria Monocytogenes* Infection ». *PloS One* 7 (5): e37349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037349>.
- Abergel, Rebecca J., Jeffrey A. Warner, David K. Shuh, et Kenneth N. Raymond. 2006. « Enterobactin Protonation and Iron Release: Structural Characterization of the Salicylate Coordination Shift in Ferric Enterobactin ». *Journal of the American Chemical Society* 128 (27): 8920- 31. <https://doi.org/10.1021/ja062046j>.
- Adams, J. L., et R. J. McLean. 1999. « Impact of RpoS Deletion on *Escherichia Coli* Biofilms ». *Applied and Environmental Microbiology* 65 (9): 4285- 87.
- Adams, Kristin N., Kevin Takaki, Lynn E. Connolly, Heather Wiedenhoft, Kathryn Winglee, Olivier Humbert, Paul H. Edelstein, Christine L. Cosma, et Lalita Ramakrishnan. 2011. « Drug Tolerance in Replicating Mycobacteria Mediated by a Macrophage-Induced Efflux Mechanism ». *Cell* 145 (1): 39- 53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.022>.
- Agbor, Terence A., et Beth A. McCormick. 2011. « Salmonella Effectors: Important Players Modulating Host Cell Function during Infection ». *Cellular Microbiology* 13 (12): 1858- 69. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01701.x>.
- Alegria, Marcos C., Diorge P. Souza, Maxuel O. Andrade, Cassia Docena, Leticia Khater, Carlos H. I. Ramos, Ana C. R. da Silva, et Chuck S. Farah. 2005. « Identification of New Protein-Protein Interactions Involving the Products of the Chromosome- and Plasmid-Encoded Type IV Secretion Loci of the Phytopathogen *Xanthomonas Axonopodis* Pv. Citri ». *Journal of Bacteriology* 187 (7): 2315- 25. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2315-2325.2005>.
- Alhagamhmad, Moftah H., Andrew S. Day, Daniel A. Lemberg, et Steven T. Leach. 2016a. « An Overview of the Bacterial Contribution to Crohn Disease Pathogenesis ». *Journal of Medical Microbiology* 65 (10): 1049- 59. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000331>.
- . 2016b. « An Overview of the Bacterial Contribution to Crohn Disease Pathogenesis ». *Journal of Medical Microbiology* 65 (10): 1049- 59. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000331>.
- Alhede, Maria, Thomas Bjarnsholt, Michael Givskov, et Morten Alhede. 2014. « Chapter One - *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Mechanisms of Immune Evasion ». In *Advances in Applied Microbiology*, édité par Sima Sariaslani et Geoffrey M. Gadd, 86:1- 40. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00001-9>.
- Allegrucci, Magee, F. Z. Hu, K. Shen, J. Hayes, Garth D. Ehrlich, J. Christopher Post, et Karin Sauer. 2006. « Phenotypic Characterization of *Streptococcus pneumoniae* Biofilm Development ». *Journal of Bacteriology* 188 (7): 2325- 35. <https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2325-2335.2006>.
- Allegrucci, Magee, et Karin Sauer. 2007. « Characterization of Colony Morphology Variants Isolated from *Streptococcus Pneumoniae* Biofilms ». *Journal of Bacteriology* 189 (5): 2030- 38. <https://doi.org/10.1128/JB.01369-06>.
- Amato, Stephanie M., et Mark P. Brynildsen. 2015. « Persister Heterogeneity Arising from a Single Metabolic Stress ». *Current Biology: CB* 25 (16): 2090- 98. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.034>.
- Amorena, B., E. Gracia, M. Monzón, J. Leiva, C. Oteiza, M. Pérez, J. L. Alabart, et J. Hernández-Yago. 1999. « Antibiotic Susceptibility Assay for *Staphylococcus Aureus* in Biofilms Developed in Vitro ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44 (1): 43- 55. <https://doi.org/10.1093/jac/44.1.43>.
- Andersen, Kell K., Brian S. Vad, Carsten Scavenius, Jan J. Enghild, et Daniel E. Otzen. 2017. « Human Lysozyme Peptidase Resistance Is Perturbed by the Anionic Glycolipid Biosurfactant

- Rhamnolipid Produced by the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* ». *Biochemistry* 56 (1): 260- 70. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01009>.
- Anderson, Gregory G., Joseph J. Palermo, Joel D. Schilling, Robyn Roth, John Heuser, et Scott J. Hultgren. 2003a. « Intracellular Bacterial Biofilm-Like Pods in Urinary Tract Infections ». *Science* 301 (5629): 105- 7. <https://doi.org/10.1126/science.1084550>.
- . 2003b. « Intracellular Bacterial Biofilm-like Pods in Urinary Tract Infections ». *Science (New York, N.Y.)* 301 (5629): 105- 7. <https://doi.org/10.1126/science.1084550>.
- Appelberg, Rui. 2006. « Macrophage nutritive antimicrobial mechanisms ». *Journal of Leukocyte Biology* 79 (6): 1117- 28. <https://doi.org/10.1189/jlb.0206079>.
- Arnoldini, Markus, Rafal Mostowy, Sebastian Bonhoeffer, et Martin Ackermann. 2012. « Evolution of Stress Response in the Face of Unreliable Environmental Signals ». *PLoS Computational Biology* 8 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002627>.
- Arnoldini, Markus, Ima Avalos Vizcarra, Rafael Peña-Miller, Nicolas Stocker, Médéric Diard, Viola Vogel, Robert E. Beardmore, Wolf-Dietrich Hardt, et Martin Ackermann. 2014. « Bistable Expression of Virulence Genes in Salmonella Leads to the Formation of an Antibiotic-Tolerant Subpopulation ». *PLOS Biology* 12 (8): e1001928. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001928>.
- Azriel, Shalhevet, Alina Goren, Galia Rahav, et Ohad Gal-Mor. 2015. « The Stringent Response Regulator DksA Is Required for Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Growth in Minimal Medium, Motility, Biofilm Formation, and Intestinal Colonization ». *Infection and Immunity* 84 (1): 375- 84. <https://doi.org/10.1128/IAI.01135-15>.
- Bach, Sandrine, Alzira de Almeida, et Elisabeth Carniel. 2000. « The Yersinia high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae ». *FEMS Microbiology Letters* 183 (2): 289- 94. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08973.x>.
- Bakkeren, Erik, Jana S. Huisman, Stefan A. Fattinger, Annika Hausmann, Markus Furter, Adrian Egli, Emma Slack, et al. 2019. « Salmonella Persists Promote the Spread of Antibiotic Resistance Plasmids in the Gut ». *Nature* 573 (7773): 276- 80. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1521-8>.
- Balaban, Nathalie Q., Jack Merrin, Remy Chait, Lukasz Kowalik, et Stanislas Leibler. 2004. « Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch ». *Science (New York, N.Y.)* 305 (5690): 1622- 25. <https://doi.org/10.1126/science.1099390>.
- Banin, Ehud, Michael L. Vasil, et E. Peter Greenberg. 2005. « Iron and Pseudomonas Aeruginosa Biofilm Formation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (31): 11076- 81. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504266102>.
- Barker, Jeffrey R., et Karl E. Klose. 2007. « Molecular and Genetic Basis of Pathogenesis in Francisella Tularensis ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1105 (juin): 138- 59. <https://doi.org/10.1196/annals.1409.010>.
- Barnich, Nicolas, Jérôme Boudeau, Laurent Claret, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2003. « Regulatory and Functional Co-Operation of Flagella and Type 1 Pili in Adhesive and Invasive Abilities of AIEC Strain LF82 Isolated from a Patient with Crohn's Disease ». *Molecular Microbiology* 48 (3): 781- 94. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03468.x>.
- Barnich, Nicolas, Frédéric A. Carvalho, Anne-Lise Glasser, Claude Darcha, Peter Jantschkeff, Matthieu Allez, Harald Peeters, et al. 2007. « CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease ». *Journal of Clinical Investigation* 117 (6): 1566- 74. <https://doi.org/10.1172/JCI30504>.
- Batchelor, Roger A., Bruce M. Pearson, Lorna M. Friis, Patricia Guerry, et Jerry M. Wells. 2004. « Nucleotide Sequences and Comparison of Two Large Conjugative Plasmids from Different Campylobacter Species ». *Microbiology (Reading, England)* 150 (Pt 10): 3507- 17. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27112-0>.
- Battesti, Aurelia, Nadim Majdalani, et Susan Gottesman. 2011. « The RpoS-Mediated General Stress Response in Escherichia Coli ». *Annual Review of Microbiology* 65: 189- 213. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102946>.

- Baumgart, Daniel C, et William J Sandborn. 2012. « Crohn's Disease ». *The Lancet* 380 (9853): 1590- 1605. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60026-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60026-9).
- Bäumler, A. J., J. G. Kusters, I. Stojiljkovic, et F. Heffron. 1994. « Salmonella Typhimurium Loci Involved in Survival within Macrophages ». *Infection and Immunity* 62 (5): 1623- 30.
- Bay, Denice C., Carol A. Stremick, Carmine J. Slipski, et Raymond J. Turner. 2017. « Secondary multidrug efflux pump mutants alter Escherichia coli biofilm growth in the presence of cationic antimicrobial compounds ». *Research in Microbiology* 168 (3): 208- 21. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.11.003>.
- Beloin, Christophe, Agnès Roux, et Jean-Marc Ghigo. 2008. « Escherichia coli biofilms ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 322: 249- 89.
- Benihoud, K., S. Esselin, D. Descamps, B. Jullienne, B. Salone, P. Bobé, D. Bonardelle, et al. 2007. « Respective Roles of TNF- α and IL-6 in the Immune Response-Elicited by Adenovirus-Mediated Gene Transfer in Mice ». *Gene Therapy* 14 (6): 533- 44. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302885>.
- Bereswill, Stefan, Stefan Greiner, Arnoud H. M. van Vliet, Barbara Waidner, Frank Fassbinder, Emile Schiltz, Johannes G. Kusters, et Manfred Kist. 2000. « Regulation of Ferritin-Mediated Cytoplasmic Iron Storage by the Ferric Uptake Regulator Homolog (Fur) of Helicobacter Pylori ». *Journal of Bacteriology* 182 (21): 5948- 53. <https://doi.org/10.1128/JB.182.21.5948-5953.2000>.
- Bergsbaken, Tessa, Susan L. Fink, et Brad T. Cookson. 2009. « Pyroptosis: Host Cell Death and Inflammation ». *Nature Reviews. Microbiology* 7 (2): 99- 109. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>.
- Berin, M. Cecilia, Hongxing Li, et Kirk Sperber. 2006. « Antibody-Mediated Antigen Sampling across Intestinal Epithelial Barriers ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1072 (1): 253- 61. <https://doi.org/10.1196/annals.1326.002>.
- Bernier, Steve P., David Lebeaux, Alicia S. DeFrancesco, Amandine Valomon, Guillaume Soubigou, Jean-Yves Coppée, Jean-Marc Ghigo, et Christophe Beloin. 2013. « Starvation, Together with the SOS Response, Mediates High Biofilm-Specific Tolerance to the Fluoroquinolone Ofloxacin ». *PLoS Genetics* 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003144>.
- Beveridge, Terry J. 1999. « Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles ». *Journal of Bacteriology* 181 (16): 4725- 33.
- Bielen, Kenny, Bart 'S Jongers, Jan Boddart, Tom K. Raju, Christine Lammens, Surbhi Malhotra-Kumar, Philippe G. Jorens, Herman Goossens, et Samir Kumar-Singh. 2017. « Biofilm-Induced Type 2 Innate Immunity in a Cystic Fibrosis Model of Pseudomonas aeruginosa ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (juin). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00274>.
- Bokranz, Werner, Xiaoda Wang, Helmut Tschäpe, et Ute Römling. 2005. « Expression of Cellulose and Curli Fimbriae by Escherichia Coli Isolated from the Gastrointestinal Tract ». *Journal of Medical Microbiology* 54 (Pt 12): 1171- 82. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46064-0>.
- BoseDasgupta, Somdeb, et Jean Pieters. 2018. « Macrophage-Microbe Interaction: Lessons Learned from the Pathogen Mycobacterium Tuberculosis ». *Seminars in Immunopathology* 40 (6): 577- 91. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0710-0>.
- Boudeau, Jérôme, Nicolas Barnich, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2001. « Type 1 Pili-Mediated Adherence of Escherichia Coli Strain LF82 Isolated from Crohn's Disease Is Involved in Bacterial Invasion of Intestinal Epithelial Cells ». *Molecular Microbiology* 39 (5): 1272- 84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2001.02315.x>.
- Boudeau, Jerome, Anne-Lise Glasser, Estelle Masseret, Bernard Joly, et Arlette Darfeuille-Michaud. 1999. « Invasive Ability of an Escherichia Coli Strain Isolated from the Ileal Mucosa of a Patient with Crohn's Disease ». *Infection and Immunity* 67 (9): 4499- 4509.
- Boyer, Frédéric, Gwennaële Fichant, Jérémie Berthod, Yves Vandenbrouck, et Ina Attree. 2009. « Dissecting the Bacterial Type VI Secretion System by a Genome Wide in Silico Analysis: What Can Be Learned from Available Microbial Genomic Resources? » *BMC Genomics* 10 (mars): 104. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-104>.

- Branca, Jacopo J. V., Massimo Gulisano, et Claudio Nicoletti. 2019. « Intestinal epithelial barrier functions in ageing ». *Ageing Research Reviews* 54 (septembre): 100938. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100938>.
- Brauner, A., S. H. Jacobson, et I. Kühn. 1992. « Urinary Escherichia Coli Causing Recurrent Infections-- a Prospective Follow-up of Biochemical Phenotypes ». *Clinical Nephrology* 38 (6): 318- 23.
- Bretin, Alexis, Cécily Lucas, Anaïs Larabi, Guillaume Dalmasso, Elisabeth Billard, Nicolas Barnich, Richard Bonnet, et Hang Thi Thu Nguyen. 2018. « AIEC Infection Triggers Modification of Gut Microbiota Composition in Genetically Predisposed Mice, Contributing to Intestinal Inflammation ». *Scientific Reports* 8 (1): 1- 14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30055-y>.
- Bringer, Marie-Agnès, Nicolas Barnich, Anne-Lise Glasser, Olivier Bardot, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2005a. « HtrA Stress Protein Is Involved in Intramacrophagic Replication of Adherent and Invasive Escherichia coli Strain LF82 Isolated from a Patient with Crohn's Disease ». *Infection and Immunity* 73 (2): 712- 21. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.712-721.2005>.
- . 2005b. « HtrA Stress Protein Is Involved in Intramacrophagic Replication of Adherent and Invasive Escherichia Coli Strain LF82 Isolated from a Patient with Crohn's Disease ». *Infection and Immunity* 73 (2): 712- 21. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.712-721.2005>.
- Bringer, Marie-Agnès, Elisabeth Billard, Anne-Lise Glasser, Jean-Frédéric Colombel, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2012. « Replication of Crohn's Disease-Associated AIEC within Macrophages Is Dependent on TNF- α Secretion ». *Laboratory Investigation* 92 (3): 411- 19. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.156>.
- Bringer, Marie-Agnès, Anne-Lise Glasser, Ching-Hsuan Tung, Stéphane Méresse, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2006a. « The Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia Coli Strain LF82 Replicates in Mature Phagolysosomes within J774 Macrophages ». *Cellular Microbiology* 8 (3): 471- 84. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00639.x>.
- . 2006b. « The Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages ». *Cellular Microbiology* 8 (3): 471- 84. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00639.x>.
- Bringer, Marie-Agnès, Nathalie Rolhion, Anne-Lise Glasser, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2007a. « The Oxidoreductase DsbA Plays a Key Role in the Ability of the Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia Coli Strain LF82 to Resist Macrophage Killing ». *Journal of Bacteriology* 189 (13): 4860- 71. <https://doi.org/10.1128/JB.00233-07>.
- . 2007b. « The Oxidoreductase DsbA Plays a Key Role in the Ability of the Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia Coli Strain LF82 To Resist Macrophage Killing ». *Journal of Bacteriology* 189 (13): 4860- 71. <https://doi.org/10.1128/JB.00233-07>.
- Brombacher, Eva, Andrea Baratto, Corinne Dorel, et Paolo Landini. 2006. « Gene Expression Regulation by the Curli Activator CsgD Protein: Modulation of Cellulose Biosynthesis and Control of Negative Determinants for Microbial Adhesion ». *Journal of Bacteriology* 188 (6): 2027- 37. <https://doi.org/10.1128/JB.188.6.2027-2037.2006>.
- Brooun, A., S. Liu, et K. Lewis. 2000. « A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in Pseudomonas Aeruginosa Biofilms ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (3): 640- 46. <https://doi.org/10.1128/aac.44.3.640-646.2000>.
- Brown, G. C., A. Vilalta, et M. Fricker. 2015. « Phagoptosis - Cell Death By Phagocytosis - Plays Central Roles in Physiology, Host Defense and Pathology ». *Current Molecular Medicine* 15 (9): 842- 51.
- Brown, Larissa, Daniel Gentry, Thomas Elliott, et Michael Cashel. 2002. « DksA Affects ppGpp Induction of RpoS at a Translational Level ». *Journal of Bacteriology* 184 (16): 4455- 65. <https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4455-4465.2002>.
- Bruin, Olle M. de, Jagjit S. Ludu, et Francis E. Nano. 2007. « The Francisella Pathogenicity Island Protein IgIA Localizes to the Bacterial Cytoplasm and Is Needed for Intracellular Growth ». *BMC Microbiology* 7 (janvier): 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-1>.

- Brumell, John H., Patrick Tang, Scott D. Mills, et B. Brett Finlay. 2001. « Characterization of Salmonella-Induced Filaments (Sifs) Reveals a Delayed Interaction Between Salmonella-Containing Vacuoles and Late Endocytic Compartments ». *Traffic* 2 (9): 643- 53. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.20907.x>.
- Buret, Andre Gerald, Jean-Paul Motta, Thibault Allain, Jose Ferraz, et John Lawrence Wallace. 2019. « Pathobiont release from dysbiotic gut microbiota biofilms in intestinal inflammatory diseases: a role for iron? » *Journal of Biomedical Science* 26 (janvier). <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0495-4>.
- Buttó, Ludovica F., Monika Schaubeck, et Dirk Haller. 2015. « Mechanisms of Microbe-Host Interaction in Crohn's Disease: Dysbiosis vs. Pathobiont Selection ». *Frontiers in Immunology* 6: 555. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00555>.
- Carpenter, Chandra, et Shelley M. Payne. 2014. « Regulation of iron transport systems in Enterobacteriaceae in response to oxygen and iron availability ». *Journal of inorganic biochemistry* 133 (avril): 110- 17. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.01.007>.
- Cascales, Eric. 2008. « The type VI secretion toolkit ». *EMBO reports* 9 (8): 735- 41. <https://doi.org/10.1038/embo.2008.131>.
- Celli, Jean, Chantal de Chastellier, Don-Marc Franchini, Javier Pizarro-Cerda, Edgardo Moreno, et Jean-Pierre Gorvel. 2003. « Brucella Evades Macrophage Killing via VirB-Dependent Sustained Interactions with the Endoplasmic Reticulum ». *Journal of Experimental Medicine* 198 (4): 545- 56. <https://doi.org/10.1084/jem.20030088>.
- Cerca, Nuno, Kimberly K. Jefferson, Rosario Oliveira, Gerald B. Pier, et Joana Azeredo. 2006. « Comparative Antibody-Mediated Phagocytosis of Staphylococcus Epidermidis Cells Grown in a Biofilm or in the Planktonic State ». *Infection and Immunity* 74 (8): 4849- 55. <https://doi.org/10.1128/IAI.00230-06>.
- Cerca, Nuno, Tomás Maira-Litrán, Kimberly K. Jefferson, Martha Grout, Donald A. Goldmann, et Gerald B. Pier. 2007. « Protection against Escherichia Coli Infection by Antibody to the Staphylococcus Aureus Poly-N-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (18): 7528- 33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700630104>.
- Céspedes, Sandra, Waleska Saitz, Felipe Del Canto, Marjorie De la Fuente, Rodrigo Quera, Marcela Hermoso, Raúl Muñoz, et al. 2017. « Genetic Diversity and Virulence Determinants of Escherichia Coli Strains Isolated from Patients with Crohn's Disease in Spain and Chile ». *Frontiers in Microbiology* 8: 639. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00639>.
- Chai, Yunrong, Frances Chu, Roberto Kolter, et Richard Losick. 2008. « Bistability and Biofilm Formation in Bacillus subtilis ». *Molecular microbiology* 67 (2): 254- 63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06040.x>.
- Chakraborty, Smarajit, Hideaki Mizusaki, et Linda J. Kenney. 2015. « A FRET-Based DNA Biosensor Tracks OmpR-Dependent Acidification of Salmonella during Macrophage Infection ». *PLoS Biology* 13 (4): e1002116. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002116>.
- Chargui, Abderrahman, Annabelle Cesaro, Sanda Mimouna, Mohamed Fareh, Patrick Brest, Philippe Naquet, Arlette Darfeuille-Michaud, et al. 2012. « Subversion of Autophagy in Adherent Invasive Escherichia coli-Infected Neutrophils Induces Inflammation and Cell Death ». *PLoS ONE* 7 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051727>.
- Chassaing, Benoit, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2013. « The ΣE Pathway Is Involved in Biofilm Formation by Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia Coli ». *Journal of Bacteriology* 195 (1): 76- 84. <https://doi.org/10.1128/JB.01079-12>.
- Chastellier, C. de, et L. Thilo. 1997. « Phagosome Maturation and Fusion with Lysosomes in Relation to Surface Property and Size of the Phagocytic Particle ». *European Journal of Cell Biology* 74 (1): 49- 62.
- Chauvaux, Sylvie, Marie-Laure Rosso, Lionel Frangeul, Céline Lacroix, Laurent Labarre, Angèle Schiavo, Michaël Marceau, et al. 2007. « Transcriptome Analysis of Yersinia Pestis in Human Plasma: An Approach for Discovering Bacterial Genes Involved in Septicaemic Plague ».

- Microbiology (Reading, England)* 153 (Pt 9): 3112- 24.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/006213-0>.
- Choi, Augustine M. K., Stefan W. Ryter, et Beth Levine. 2013. « Autophagy in Human Health and Disease ». *The New England Journal of Medicine* 368 (7): 651- 62.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1205406>.
- Christie, Peter J., et Eric Cascales. 2005. « Structural and dynamic properties of bacterial Type IV secretion systems (Review) ». *Molecular membrane biology* 22 (0): 51- 61.
- Chu, Eric K., Onur Kilic, Hojung Cho, Alex Groisman, et Andre Levchenko. 2018. « Self-Induced Mechanical Stress Can Trigger Biofilm Formation in Uropathogenic Escherichia Coli ». *Nature Communications* 9 (1): 1- 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06552-z>.
- Claudi, Beatrice, Petra Spröte, Anna Chirkova, Nicolas Personnic, Janine Zankl, Nura Schürmann, Alexander Schmidt, et Dirk Bumann. 2014. « Phenotypic Variation of Salmonella in Host Tissues Delays Eradication by Antimicrobial Chemotherapy ». *Cell* 158 (4): 722- 33.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.045>.
- Clausen, Tim, Chris Southan, et Michael Ehrmann. 2002. « The HtrA Family of Proteases: Implications for Protein Composition and Cell Fate ». *Molecular Cell* 10 (3): 443- 55.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00658-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00658-5).
- Cogger-Ward, Robert, Adam Collins, Denise McLean, Jacob Dehinsilu, et Alan Huett. 2019. « A Conserved Protein, BcmA, Mediates Motility, Biofilm Formation, and Host Colonisation in Adherent Invasive Escherichia Coli ». *BioRxiv*, avril, 606798. <https://doi.org/10.1101/606798>.
- Cohen, Nadia R., Michael A. Lobritz, et James J. Collins. 2013. « Microbial Persistence and the Road to Drug Resistance ». *Cell Host & Microbe* 13 (6): 632- 42.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.009>.
- Collins, Adam, et Alan Huett. 2018. « A Multi-Phenotypic Imaging Screen to Identify Bacterial Effectors by Exogenous Expression in a HeLa Cell Line ». *Scientific Data* 5: 180081.
<https://doi.org/10.1038/sdata.2018.81>.
- Colvin, Kelly M., Vernita D. Gordon, Keiji Murakami, Bradley R. Borlee, Daniel J. Wozniak, Gerard C. L. Wong, et Matthew R. Parsek. 2011. « The Pel Polysaccharide Can Serve a Structural and Protective Role in the Biofilm Matrix of Pseudomonas Aeruginosa ». *PLoS Pathogens* 7 (1): e1001264. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001264>.
- Conte, Maria P., Marta Aleandri, Massimiliano Marazzato, Antonietta L. Conte, Cecilia Ambrosi, Mauro Nicoletti, Carlo Zagaglia, et al. 2016. « The Adherent/Invasive Escherichia Coli Strain LF82 Invades and Persists in Human Prostate Cell Line RWPE-1, Activating a Strong Inflammatory Response ». *Infection and Immunity* 84 (11): 3105- 13.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00438-16>.
- Cornelis, Guy R. 2006. « The Type III Secretion Injectisome ». *Nature Reviews Microbiology* 4 (11): 811- 25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1526>.
- Cossart, P, et M Lecuit. 1998. « Interactions of Listeria monocytogenes with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. » *The EMBO Journal* 17 (14): 3797- 3806. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.14.3797>.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, et E. P. Greenberg. 1999. « Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections ». *Science (New York, N.Y.)* 284 (5418): 1318- 22.
<https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>.
- Coulthurst, Sarah J. 2013. « The Type VI secretion system – a widespread and versatile cell targeting system ». *Research in Microbiology, Bacterial secretion systems: function and structural biology*, 164 (6): 640- 54. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.017>.
- Crichton, R. R., et M. Charletoaux-Wauters. 1987. « Iron Transport and Storage ». *European Journal of Biochemistry* 164 (3): 485- 506. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb11155.x>.
- Crosa, Jorge H., et Christopher T. Walsh. 2002. « Genetics and Assembly Line Enzymology of Siderophore Biosynthesis in Bacteria ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (2): 223- 49. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.2.223-249.2002>.

- Croxen, Matthew A., Robyn J. Law, Roland Scholz, Kristie M. Keeney, Marta Wlodarska, et B. Brett Finlay. 2013. « Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia Coli ». *Clinical Microbiology Reviews* 26 (4): 822- 80. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>.
- Da Re, Sandra, et Jean-Marc Ghigo. 2006. « A CsgD-Independent Pathway for Cellulose Production and Biofilm Formation in Escherichia coli ». *Journal of Bacteriology* 188 (8): 3073- 87. <https://doi.org/10.1128/JB.188.8.3073-3087.2006>.
- Danese, Paul N., Leslie A. Pratt, et Roberto Kolter. 2000. « Exopolysaccharide Production Is Required for Development of Escherichia coli K-12 Biofilm Architecture ». *Journal of Bacteriology* 182 (12): 3593- 96.
- Darfeuille-Michaud, A., C. Neut, N. Barnich, E. Lederman, P. Di Martino, P. Desreumaux, L. Gambiez, B. Joly, A. Cortot, et J. F. Colombel. 1998. « Presence of Adherent Escherichia Coli Strains in Ileal Mucosa of Patients with Crohn's Disease ». *Gastroenterology* 115 (6): 1405- 13. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70019-8](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70019-8).
- Darfeuille-Michaud, Arlette. 2002. « Adherent-invasive Escherichia coli: a putative new E. coli pathotype associated with Crohn's disease ». *International Journal of Medical Microbiology* 292 (3): 185- 93. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00201>.
- Darfeuille-Michaud, Arlette, Jérôme Boudeau, Philippe Bulois, Christel Neut, Anne-Lise Glasser, Nicolas Barnich, Marie-Agnès Bringer, Alexander Swidsinski, Laurent Beaugerie, et Jean-Frédéric Colombel. 2004. « High Prevalence of Adherent-Invasive Escherichia Coli Associated with Ileal Mucosa in Crohn's Disease ». *Gastroenterology* 127 (2): 412- 21. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.04.061>.
- Davies, David G., et Cláudia N. H. Marques. 2009. « A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms ». *Journal of Bacteriology* 191 (5): 1393- 1403. <https://doi.org/10.1128/JB.01214-08>.
- Dean, Paul. 2011. « Functional Domains and Motifs of Bacterial Type III Effector Proteins and Their Roles in Infection ». *FEMS Microbiology Reviews* 35 (6): 1100- 1125. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00271.x>.
- Denning, Timothy L, Yi-chong Wang, Seema R Patel, Ifor R Williams, et Bali Pulendran. 2007. « Lamina Propria Macrophages and Dendritic Cells Differentially Induce Regulatory and Interleukin 17-Producing T Cell Responses ». *Nature Immunology* 8 (10): 1086- 94. <https://doi.org/10.1038/ni1511>.
- DePas, William H., David A. Hufnagel, John S. Lee, Luz P. Blanco, Hans C. Bernstein, Steve T. Fisher, Garth A. James, Philip S. Stewart, et Matthew R. Chapman. 2013. « Iron induces bimodal population development by Escherichia coli ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (7): 2629- 34. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218703110>.
- Desai, M., T. Bühler, P. H. Weller, et M. R. Brown. 1998. « Increasing Resistance of Planktonic and Biofilm Cultures of Burkholderia Cepacia to Ciprofloxacin and Ceftazidime during Exponential Growth ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 42 (2): 153- 60. <https://doi.org/10.1093/jac/42.2.153>.
- Dikshit, Neha, Pradeep Bist, Shannon N. Fenlon, Niyas Kudukkil Pulloor, Christelle En Lin Chua, Marci A. Scidmore, Jason A. Carlyon, Bor Luen Tang, Swaine L. Chen, et Bindu Sukumaran. 2015. « Intracellular Uropathogenic E. coli Exploits Host Rab35 for Iron Acquisition and Survival within Urinary Bladder Cells ». *PLoS Pathogens* 11 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005083>.
- Dogan, Belgin, Haruo Suzuki, Deepali Herlekar, R. Balfour Sartor, Barry J. Campbell, Carol L. Roberts, Katrina Stewart, et al. 2014. « Inflammation-associated Adherent-invasive Escherichia coli Are Enriched in Pathways for Use of Propanediol and Iron and M-cell Translocation ». *Inflammatory Bowel Diseases* 20 (11): 1919- 32. <https://doi.org/10.1097/MIB.000000000000183>.
- Donlan, Rodney M. 2002. « Biofilms: Microbial Life on Surfaces ». *Emerging Infectious Diseases* 8 (9): 881- 90. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>.

- Donlan, Rodney M., et J. William Costerton. 2002. « Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms ». *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2): 167- 93. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>.
- Donskey, Curtis J., Sirisha Kundrapu, et Abhishek Deshpande. 2015. « Colonization versus Carriage of Clostridium Difficile ». *Infectious Disease Clinics of North America* 29 (1): 13- 28. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2014.11.001>.
- Dörr, Tobias, Kim Lewis, et Marin Vulić. 2009. « SOS Response Induces Persistence to Fluoroquinolones in Escherichia coli ». *PLoS Genetics* 5 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000760>.
- Dörr, Tobias, Marin Vulić, et Kim Lewis. 2010. « Ciprofloxacin Causes Persister Formation by Inducing the TisB toxin in Escherichia coli ». *PLoS Biology* 8 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000317>.
- Drecktrah, Dan, Leigh A Knodler, Dale Howe, et Olivia Steele-Mortimer. 2007. « Salmonella Trafficking is Defined by Continuous Dynamic Interactions with the Endolysosomal System ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8 (3): 212- 25. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00529.x>.
- Dreux, Nicolas, Jérémy Denizot, Margarita Martinez-Medina, Alexander Mellmann, Maria Billig, Dagmara Kisiela, Sujay Chattopadhyay, et al. 2013. « Point Mutations in FimH Adhesin of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli Enhance Intestinal Inflammatory Response ». *PLoS Pathogens* 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003141>.
- Duguid, I. G., E. Evans, M. R. Brown, et P. Gilbert. 1992. « Growth-Rate-Independent Killing by Ciprofloxacin of Biofilm-Derived Staphylococcus Epidermidis; Evidence for Cell-Cycle Dependency ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 30 (6): 791- 802. <https://doi.org/10.1093/jac/30.6.791>.
- Dunne, Karl A., Amr Allam, Anne McIntosh, Stephanie A. Houston, Vuk Cerovic, Carl S. Goodyear, Andrew J. Roe, et al. 2013. « Increased S-Nitrosylation and Proteasomal Degradation of Caspase-3 during Infection Contribute to the Persistence of Adherent Invasive Escherichia coli (AIEC) in Immune Cells ». *PLoS ONE* 8 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068386>.
- Dunne, W. Michael. 2002. « Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? ». *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2): 155- 66. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.155-166.2002>.
- Eaves-Pyles, Tonyia, Christopher A. Allen, Joanna Taormina, Alexander Swidsinski, Christopher B. Tutt, G. Eric Jezek, Martha Islas-Islas, et Alfredo G. Torres. 2008. « Escherichia coli isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells ». *International Journal of Medical Microbiology* 298 (5): 397- 409. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.05.011>.
- Eisele, Nicholas A., Thomas Ruby, Amanda Jacobson, Paolo S. Manzanillo, Jeffery S. Cox, Lilian Lam, Lata Mukundan, Ajay Chawla, et Denise M. Monack. 2013. « Salmonella Require the Fatty Acid Regulator PPAR δ for the Establishment of a Metabolic Environment Essential for Long-Term Persistence ». *Cell Host & Microbe* 14 (2): 171- 82. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.010>.
- Ellermann, Melissa, Eun Young Huh, Bo Liu, Ian M. Carroll, Rita Tamayo, et R. Balfour Sartor. 2015. « Adherent-Invasive Escherichia coli Production of Cellulose Influences Iron-Induced Bacterial Aggregation, Phagocytosis, and Induction of Colitis ». *Infection and Immunity* 83 (10): 4068- 80. <https://doi.org/10.1128/IAI.00904-15>.
- Ellermann, Melissa, et R. Balfour Sartor. 2018. « Intestinal bacterial biofilms modulate mucosal immune responses ». *Journal of immunological sciences* 2 (2): 13- 18.
- Engle, Matthias, Elmar Stöbel, Kirstin Castiglione, Nives Schwerdtner, Manfred Wagner, Pal Bölcskei, Martin Röllinghoff, et Steffen Stenger. 2002. « Induction of TNF in Human Alveolar Macrophages As a Potential Evasion Mechanism of Virulent Mycobacterium Tuberculosis ». *The Journal of Immunology* 168 (3): 1328- 37. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.3.1328>.

- Engledow, Amanda S., Enrique G. Medrano, Eshwar Mahenthiralingam, John J. LiPuma, et Carlos F. Gonzalez. 2004. « Involvement of a Plasmid-Encoded Type IV Secretion System in the Plant Tissue Watersoaking Phenotype of Burkholderia Cenocepacia ». *Journal of Bacteriology* 186 (18): 6015- 24. <https://doi.org/10.1128/JB.186.18.6015-6024.2004>.
- Enos-Berlage, Jodi L., Zehra T. Guvener, Carrie E. Keenan, et Linda L. McCarter. 2005. « Genetic Determinants of Biofilm Development of Opaque and Translucent Vibrio Parahaemolyticus ». *Molecular Microbiology* 55 (4): 1160- 82. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04453.x>.
- Evans, Margery L., Erik Chorell, Jonathan D. Taylor, Jörgen Åden, Anna Götheson, Fei Li, Marion Koch, et al. 2015. « The Bacterial Curli System Possesses a Potent and Selective Inhibitor of Amyloid Formation ». *Molecular Cell* 57 (3): 445- 55. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.025>.
- Eylert, Eva, Jennifer Schär, Sonja Mertins, Regina Stoll, Adelbert Bacher, Werner Goebel, et Wolfgang Eisenreich. 2008. « Carbon Metabolism of Listeria Monocytogenes Growing inside Macrophages ». *Molecular Microbiology* 69 (4): 1008- 17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06337.x>.
- Fahlgren, A., V. Baranov, L. Frängsmyr, F. Zoubir, M.-L. Hammarström, et S. Hammarström. 2003. « Interferon-Gamma Tempers the Expression of Carcinoembryonic Antigen Family Molecules in Human Colon Cells: A Possible Role in Innate Mucosal Defence ». *Scandinavian Journal of Immunology* 58 (6): 628- 41. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2003.01342.x>.
- Falla, Timothy J., et Ian Chopra. 1998. « Joint Tolerance to β -Lactam and Fluoroquinolone Antibiotics in Escherichia Coli Results from Overexpression of HipA ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (12): 3282- 84. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.12.3282>.
- Figueira, Rita, Kathryn G. Watson, David W. Holden, et Sophie Helaine. 2013. « Identification of Salmonella Pathogenicity Island-2 Type III Secretion System Effectors Involved in Intramacrophage Replication of S. enterica Serovar Typhimurium: Implications for Rational Vaccine Design ». *mBio* 4 (2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00065-13>.
- Fink, Susan L., et Brad T. Cookson. 2005. « Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells ». *Infection and Immunity* 73 (4): 1907- 16. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>.
- Fisher, Robert A., Bridget Gollan, et Sophie Helaine. 2017. « Persistent Bacterial Infections and Persister Cells ». *Nature Reviews Microbiology* 15 (8): 453- 64. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>.
- Flannagan, Ronald S., Gabriela Cosío, et Sergio Grinstein. 2009. « Antimicrobial Mechanisms of Phagocytes and Bacterial Evasion Strategies ». *Nature Reviews Microbiology* 7 (5): 355- 66. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2128>.
- Flemming, Hans-Curt, et Jost Wingender. 2010a. « The Biofilm Matrix ». *Nature Reviews Microbiology* 8 (9): 623- 33. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
- . 2010b. « The Biofilm Matrix ». *Nature Reviews. Microbiology* 8 (9): 623- 33. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
- Flemming, Hans-Curt, Jost Wingender, Ulrich Szewzyk, Peter Steinberg, Scott A. Rice, et Staffan Kjelleberg. 2016. « Biofilms: An Emergent Form of Bacterial Life ». *Nature Reviews Microbiology* 14 (9): 563- 75. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>.
- Fong, Jiunn N. C., et Fitnat H. Yildiz. 2015. « Biofilm Matrix Proteins ». *Microbiology spectrum* 3 (2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014>.
- Foxman, B., L. Zhang, P. Tallman, K. Palin, C. Rode, C. Bloch, B. Gillespie, et C. F. Marrs. 1995. « Virulence Characteristics of Escherichia Coli Causing First Urinary Tract Infection Predict Risk of Second Infection ». *The Journal of Infectious Diseases* 172 (6): 1536- 41. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1536>.
- Foxman, Betsy. 2003. « Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs ». *Disease-a-Month* 49 (2): 53- 70. <https://doi.org/10.1067/mda.2003.7>.
- Franklin, Michael J., David E. Nivens, Joel T. Weadge, et P. Lynne Howell. 2011. « Biosynthesis of the Pseudomonas Aeruginosa Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl ». *Frontiers in Microbiology* 2: 167. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00167>.

- Fridman, Ofer, Amir Goldberg, Irine Ronin, Noam Shoshani, et Nathalie Q. Balaban. 2014. « Optimization of Lag Time Underlies Antibiotic Tolerance in Evolved Bacterial Populations ». *Nature* 513 (7518): 418- 21. <https://doi.org/10.1038/nature13469>.
- Fung, Danny K. C., Edward W. C. Chan, Miu L. Chin, et Raphael C. Y. Chan. 2010. « Delineation of a Bacterial Starvation Stress Response Network Which Can Mediate Antibiotic Tolerance Development ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (3): 1082- 93. <https://doi.org/10.1128/AAC.01218-09>.
- Gama-Castro, Socorro, Heladia Salgado, Alberto Santos-Zavaleta, Daniela Ledezma-Tejeida, Luis Muñiz-Rascado, Jair Santiago García-Sotelo, Kevin Alquicira-Hernández, et al. 2016. « RegulonDB Version 9.0: High-Level Integration of Gene Regulation, Coexpression, Motif Clustering and Beyond ». *Nucleic Acids Research* 44 (D1): D133-143. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1156>.
- Ganeshan, Kirthana, et Ajay Chawla. 2014. « Metabolic Regulation of Immune Responses ». *Annual Review of Immunology* 32: 609- 34. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120236>.
- Gibold, Lucie, Estelle Garenaux, Guillaume Dalmaso, Camille Gallucci, David Cia, Benoit Mottet-Auselo, Tiphonie Faïs, et al. 2016. « The Vat-AIEC protease promotes crossing of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated Escherichia coli ». *Cellular Microbiology* 18 (5): 617- 31. <https://doi.org/10.1111/cmi.12539>.
- Glasser, Anne-Lise, Jerome Boudeau, Nicolas Barnich, Marie-Helene Perruchot, Jean-Frederic Colombel, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2001. « Adherent Invasive Escherichia Coli Strains from Patients with Crohn's Disease Survive and Replicate within Macrophages without Inducing Host Cell Death ». *Infection and Immunity* 69 (9): 5529- 37. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5529-5537.2001>.
- Goetz, David H, Margaret A Holmes, Niels Borregaard, Martin E Bluhm, Kenneth N Raymond, et Roland K Strong. 2002. « The Neutrophil Lipocalin NGAL Is a Bacteriostatic Agent that Interferes with Siderophore-Mediated Iron Acquisition ». *Molecular Cell* 10 (5): 1033- 43. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00708-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00708-6).
- Gomez, James E., et John D. McKinney. 2004. « M. Tuberculosis Persistence, Latency, and Drug Tolerance ». *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 84 (1 - 2): 29- 44.
- González, Juan F, Mark M Hahn, et John S Gunn. 2018. « Chronic biofilm-based infections: skewing of the immune response ». *Pathogens and Disease* 76 (3). <https://doi.org/10.1093/femspd/fty023>.
- Goodman, Andrew L., Bridget Kulasekara, Arne Rietsch, Dana Boyd, Roger S. Smith, et Stephen Lory. 2004. « A Signaling Network Reciprocally Regulates Genes Associated with Acute Infection and Chronic Persistence in Pseudomonas Aeruginosa ». *Developmental Cell* 7 (5): 745- 54. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.08.020>.
- Goodrich, Julia K., Emily R. Davenport, Michelle Beaumont, Matthew A. Jackson, Rob Knight, Carole Ober, Tim D. Spector, Jordana T. Bell, Andrew G. Clark, et Ruth E. Ley. 2016. « Genetic determinants of the gut microbiome in UK Twins ». *Cell host & microbe* 19 (5): 731- 43. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.017>.
- Goormaghtigh, Frédéric, Nathan Fraikin, Marta Putrinš, Thibaut Hallaert, Vasili Haurlyuk, Abel Garcia-Pino, Andreas Sjödin, et al. 2018. « Reassessing the Role of Type II Toxin-Antitoxin Systems in Formation of Escherichia Coli Type II Persister Cells ». *MBio* 9 (3): e00640-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00640-18>.
- Graham, Joseph G., Laura J. MacDonald, S. Kauser Hussain, Uma M. Sharma, Richard C. Kurten, et Daniel E. Voth. 2013. « Virulent Coxiella Burnetii Pathotypes Productively Infect Primary Human Alveolar Macrophages ». *Cellular Microbiology* 15 (6): 1012- 25. <https://doi.org/10.1111/cmi.12096>.
- Grant, Matthew A. A., Bartłomiej Waclaw, Rosalind J. Allen, et Pietro Cicuta. 2014. « The role of mechanical forces in the planar-to-bulk transition in growing Escherichia coli microcolonies ».

- Journal of The Royal Society Interface* 11 (97): 20140400.
<https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0400>.
- Greub, Gilbert, et Didier Raoult. 2004. « Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae ». *Clinical Microbiology Reviews* 17 (2): 413- 33. <https://doi.org/10.1128/cmr.17.2.413-433.2004>.
- Grohmann, Elisabeth, Peter J. Christie, Gabriel Waksman, et Steffen Backert. 2018. « Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria ». *Molecular microbiology* 107 (4): 455- 71. <https://doi.org/10.1111/mmi.13896>.
- Gualdi, Luciana, Letizia Tagliabue, Stefano Bertagnoli, Teresa Ieranò, Cristina De Castro, et Paolo Landini. 2008. « Cellulose Modulates Biofilm Formation by Counteracting Curli-Mediated Colonization of Solid Surfaces in Escherichia Coli ». *Microbiology (Reading, England)* 154 (Pt 7): 2017- 24. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/018093-0>.
- Guillier, Maude, et Susan Gottesman. 2006. « Remodelling of the Escherichia Coli Outer Membrane by Two Small Regulatory RNAs ». *Molecular Microbiology* 59 (1): 231- 47.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04929.x>.
- . 2008. « The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator ». *Nucleic Acids Research* 36 (21): 6781- 94.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkn742>.
- Gunther, Nereus W., Jennifer A. Snyder, Virginia Lockett, Ian Blomfield, David E. Johnson, et Harry L. T. Mobley. 2002. « Assessment of Virulence of Uropathogenic Escherichia coli Type 1 Fimbrial Mutants in Which the Invertible Element Is Phase-Locked On or Off ». *Infection and Immunity* 70 (7): 3344- 54. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3344-3354.2002>.
- Gupta, Kajal, Julie Liao, Olga E. Petrova, K. E. Cherny, et Karin Sauer. 2014. « Elevated Levels of the Second Messenger C-Di-GMP Contribute to Antimicrobial Resistance of Pseudomonas Aeruginosa ». *Molecular Microbiology* 92 (3): 488- 506. <https://doi.org/10.1111/mmi.12587>.
- Halaas, Oyvind, Magnus Steigedal, Markus Haug, Jane A. Awuh, Liv Ryan, Andreas Brech, Shintaro Sato, et al. 2010. « Intracellular Mycobacterium Avium Intersect Transferrin in the Rab11(+) Recycling Endocytic Pathway and Avoid Lipocalin 2 Trafficking to the Lysosomal Pathway ». *The Journal of Infectious Diseases* 201 (5): 783- 92. <https://doi.org/10.1086/650493>.
- Hall-Stoodley, Luanne, J. William Costerton, et Paul Stoodley. 2004. « Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases ». *Nature Reviews Microbiology* 2 (2): 95- 108.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro821>.
- Hammarström, Sten, et Vladimir Baranov. 2001. « Is there a role for CEA in innate immunity in the colon? » *Trends in Microbiology* 9 (3): 119- 25. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)01952-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)01952-7).
- Hammerschlag, Margaret R. 2002. « The intracellular life of chlamydiae ». *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 13 (4): 239- 48. <https://doi.org/10.1053/spid.2002.127201>.
- Hancock, Viktoria, Lionel Ferrières, et Per Klemm. 2008. « The Ferric Yersiniabactin Uptake Receptor FyuA Is Required for Efficient Biofilm Formation by Urinary Tract Infectious Escherichia Coli in Human Urine ». *Microbiology (Reading, England)* 154 (Pt 1): 167- 75.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011981-0>.
- Hantke, K. 1981. « Regulation of Ferric Iron Transport in Escherichia Coli K12: Isolation of a Constitutive Mutant ». *Molecular & General Genetics: MGG* 182 (2): 288- 92.
<https://doi.org/10.1007/bf00269672>.
- Haraoka, Masashi, Long Hang, Björn Frendéus, Gabriela Godaly, Marie Burdick, Robert Strieter, et Catharina Svanborg. 1999. « Neutrophil Recruitment and Resistance to Urinary Tract Infection ». *The Journal of Infectious Diseases* 180 (4): 1220- 29.
<https://doi.org/10.1086/315006>.
- Harms, Alexander, Ditlev Egeskov Brodersen, Namiko Mitarai, et Kenn Gerdes. 2018. « Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology ». *Molecular Cell* 70 (5): 768- 84. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.003>.

- Harms, Alexander, Cinzia Fino, Michael A. Sørensen, Szabolcs Semsey, et Kenn Gerdes. 2017. « Prophages and Growth Dynamics Confound Experimental Results with Antibiotic-Tolerant Persister Cells ». *mBio* 8 (6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01964-17>.
- Harms, Alexander, Etienne Maisonneuve, et Kenn Gerdes. 2016. « Mechanisms of Bacterial Persistence during Stress and Antibiotic Exposure ». *Science* 354 (6318): aaf4268. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4268>.
- Hauryliuk, Vasili, Gemma C. Atkinson, Katsuhiko S. Murakami, Tanel Tenson, et Kenn Gerdes. 2015. « Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology ». *Nature reviews. Microbiology* 13 (5): 298- 309. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3448>.
- Hawy, A. M. el, M. M. Abdel Rahman, S. Rozik, A. F. Fawzy, et H. A. el Gammal. 1993. « Assessment of Serum Copper and Zinc Levels in Chronic Schistosoma Mansoni Patients with and without Hepatic Involvement before and after Praziquantel Therapy ». *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 23 (1): 55- 62.
- Hayek, Inaya, Christian Berens, et Anja Lührmann. 2019. « Modulation of host cell metabolism by T4SS-encoding intracellular pathogens ». *Current Opinion in Microbiology, Host-microbe interactions: bacteria*, edited by Karen M. Ottemann & Linda J. Kenney, 47 (février): 59- 65. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.11.010>.
- Helaine, Sophie, Angela M. Cheverton, Kathryn G. Watson, Laura M. Faure, Sophie A. Matthews, et David W. Holden. 2014. « Internalization of Salmonella by Macrophages Induces Formation of Nonreplicating Persisters ». *Science (New York, N.Y.)* 343 (6167): 204- 8. <https://doi.org/10.1126/science.1244705>.
- Helaine, Sophie, Jessica A. Thompson, Kathryn G. Watson, Mei Liu, Cliona Boyle, et David W. Holden. 2010. « Dynamics of Intracellular Bacterial Replication at the Single Cell Level ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (8): 3746- 51. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000041107>.
- Henderson, Jeffrey P., Jan R. Crowley, Jerome S. Pinkner, Jennifer N. Walker, Pablo Tsukayama, Walter E. Stamm, Thomas M. Hooton, et Scott J. Hultgren. 2009. « Quantitative Metabolomics Reveals an Epigenetic Blueprint for Iron Acquisition in Uropathogenic Escherichia Coli ». *PLoS Pathogens* 5 (2): e1000305. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000305>.
- Henry, Rebecca, Lee Shaughnessy, Martin J. Loessner, Christine Alberti-Segui, Darren E. Higgins, et Joel A. Swanson. 2006. « Cytolysin-dependent delay of vacuole maturation in macrophages infected with Listeria monocytogenes ». *Cellular microbiology* 8 (1): 107- 19. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00604.x>.
- Heras, Begoña, Stephen R. Shouldice, Makrina Totsika, Martin J. Scanlon, Mark A. Schembri, et Jennifer L. Martin. 2009. « DSB Proteins and Bacterial Pathogenicity ». *Nature Reviews Microbiology* 7 (3): 215- 25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2087>.
- Hiemstra, Ida H, Marieke R Beijer, Henrike Veninga, Kim Vrijland, Ellen G F Borg, Brenda J Olivier, Reina E Mebius, Georg Kraal, et Joke M M den Haan. 2014. « The identification and developmental requirements of colonic CD169+ macrophages ». *Immunology* 142 (2): 269- 78. <https://doi.org/10.1111/imm.12251>.
- Hilbi, Hubert, Gil Segal, et Howard A. Shuman. 2001. « Icm/Dot-Dependent Upregulation of Phagocytosis by Legionella Pneumophila ». *Molecular Microbiology* 42 (3): 603- 17. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02645.x>.
- Hipolito, Victoria E. B., Erika Ospina-Escobar, et Roberto J. Botelho. 2018. « Lysosome Remodelling and Adaptation during Phagocyte Activation ». *Cellular Microbiology* 20 (4): e12824. <https://doi.org/10.1111/cmi.12824>.
- Hobley, Laura, Catriona Harkins, Cait E. MacPhee, et Nicola R. Stanley-Wall. 2015. « Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes ». *FEMS Microbiology Reviews* 39 (5): 649- 69. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv015>.

- Hofsteenge, Niels, Erik van Nimwegen, et Olin K. Silander. 2013. « Quantitative Analysis of Persister Fractions Suggests Different Mechanisms of Formation among Environmental Isolates of *E. Coli* ». *BMC Microbiology* 13 (février): 25. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-25>.
- Holden, Victoria I., et Michael A. Bachman. 2015. « Diverging Roles of Bacterial Siderophores during Infection ». *Metallomics: Integrated Biometal Science* 7 (6): 986 - 95. <https://doi.org/10.1039/c4mt00333k>.
- Hooton, T. M., et W. E. Stamm. 1997. « Diagnosis and Treatment of Uncomplicated Urinary Tract Infection ». *Infectious Disease Clinics of North America* 11 (3): 551 - 81.
- Hu, P., J. Elliott, P. McCready, E. Skowronski, J. Garnes, A. Kobayashi, R. R. Brubaker, et E. Garcia. 1998. « Structural Organization of Virulence-Associated Plasmids of *Yersinia Pestis* ». *Journal of Bacteriology* 180 (19): 5192 - 5202.
- Huang, Bernice, Andree Hubber, Justin A. McDonough, Craig R. Roy, Marci A. Scidmore, et Jason A. Carlyon. 2010. « The *Anaplasma Phagocytophilum*-Occupied Vacuole Selectively Recruits Rab-GTPases That Are Predominantly Associated with Recycling Endosomes ». *Cellular Microbiology* 12 (9): 1292 - 1307. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01468.x>.
- Hunstad, David A., et Sheryl S. Justice. 2010. « Intracellular Lifestyles and Immune Evasion Strategies of Uropathogenic *Escherichia coli* ». *Annual Review of Microbiology* 64 (1): 203 - 21. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134258>.
- Huynh, Cassidy K., Eeva-Liisa Eskelinen, Cameron C. Scott, Anatoly Malevanets, Paul Saftig, et Sergio Grinstein. 2007. « LAMP Proteins Are Required for Fusion of Lysosomes with Phagosomes ». *The EMBO Journal* 26 (2): 313 - 24. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601511>.
- Hvidberg, Hanne, Carsten Struve, Karen A. Krogfelt, Nils Christensen, Søren N. Rasmussen, et Niels Frimodt-Møller. 2000. « Development of a Long-Term Ascending Urinary Tract Infection Mouse Model for Antibiotic Treatment Studies ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (1): 156 - 63.
- Ishikawa, Hirokazu, Hironori Otaka, Kimika Maki, Teppei Morita, et Hiroji Aiba. 2012. « The Functional Hfq-Binding Module of Bacterial SRNAs Consists of a Double or Single Hairpin Preceded by a U-Rich Sequence and Followed by a 3' Poly(U) Tail ». *RNA (New York, N.Y.)* 18 (5): 1062 - 74. <https://doi.org/10.1261/rna.031575.111>.
- Itoh, Yoshikane, John D. Rice, Carlos Goller, Archana Pannuri, Jeannette Taylor, Jeffrey Meisner, Terry J. Beveridge, James F. Preston, et Tony Romeo. 2008. « Roles of pgaABCD Genes in Synthesis, Modification, and Export of the *Escherichia coli* Biofilm Adhesin Poly- β -1,6-N-Acetyl-d-Glucosamine ». *Journal of Bacteriology* 190 (10): 3670 - 80. <https://doi.org/10.1128/JB.01920-07>.
- Iwasaki, Akiko, et Ruslan Medzhitov. 2015. « Control of adaptive immunity by the innate immune system ». *Nature immunology* 16 (4): 343 - 53. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>.
- Izano, Era A., Irina Sadovskaya, Evgeny Vinogradov, Martha H. Mulks, Kabilan Velliyagounder, Chandran Ragunath, William B. Kher, et al. 2007. « Poly-N-Acetylglucosamine Mediates Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in *Actinobacillus Pleuropneumoniae* ». *Microbial Pathogenesis* 43 (1): 1 - 9. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.02.004>.
- Jacob-Dubuisson, F., J. Pinkner, Z. Xu, R. Striker, A. Padmanabhan, et S. J. Hultgren. 1994. « PapD Chaperone Function in Pilus Biogenesis Depends on Oxidant and Chaperone-like Activities of DsbA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (24): 11552 - 56. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11552>.
- Jacobson, S. H., I. Kühn, et A. Brauner. 1992. « Biochemical Fingerprinting of Urinary *Escherichia Coli* Causing Recurrent Infections in Women with Pyelonephritic Renal Scarring ». *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 26 (4): 373 - 77. <https://doi.org/10.3109/00365599209181229>.
- Jamal, Muhsin, Wisal Ahmad, Saadia Andleeb, Fazal Jalil, Muhammad Imran, Muhammad Asif Nawaz, Tahir Hussain, Muhammad Ali, Muhammad Rafiq, et Muhammad Atif Kamil. 2018. « Bacterial biofilm and associated infections ». *Journal of the Chinese Medical Association* 81 (1): 7 - 11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>.

- Janion, C. 2001. « Some Aspects of the SOS Response System--a Critical Survey ». *Acta Biochimica Polonica* 48 (3): 599- 610.
- Jarry, A., L. Crémet, N. Caroff, C. Bou-Hanna, J. M. Mussini, A. Reynaud, A. L. Servin, J. F. Mosnier, V. Liévin-Le Moal, et C. L. Labois. 2015. « Subversion of Human Intestinal Mucosa Innate Immunity by a Crohn's Disease-Associated E. Coli ». *Mucosal Immunology* 8 (3): 572- 81. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.89>.
- Jenal, Urs, Alberto Reinders, et Christian Lori. 2017. « Cyclic Di-GMP: Second Messenger Extraordinaire ». *Nature Reviews Microbiology* 15 (5): 271- 84. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.190>.
- Jensen, Peter Ø, Thomas Bjarnsholt, Richard Phipps, Thomas B. Rasmussen, Henrik Calum, Lars Christoffersen, Claus Moser, et al. 2007. « Rapid Necrotic Killing of Polymorphonuclear Leukocytes Is Caused by Quorum-Sensing-Controlled Production of Rhamnolipid by Pseudomonas Aeruginosa ». *Microbiology (Reading, England)* 153 (Pt 5): 1329- 38. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003863-0>.
- Johnson, M K, et D Boese-Marrazzo. 1980. « Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from Pseudomonas aeruginosa. ». *Infection and Immunity* 29 (3): 1028- 33.
- Jolivet-Gougeon, Anne, et Martine Bonnaure-Mallet. 2014. « Biofilms as a mechanism of bacterial resistance ». *Drug Discovery Today: Technologies, Drug Resistance*, 11 (mars): 49- 56. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.003>.
- Joo, Hwang-Soo, et Michael Otto. 2012. « Molecular Basis of in Vivo Biofilm Formation by Bacterial Pathogens ». *Chemistry & Biology* 19 (12): 1503- 13. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.10.022>.
- Journet, Laure, Céline Agrain, Petr Broz, et Guy R. Cornelis. 2003. « The Needle Length of Bacterial Injectisomes Is Determined by a Molecular Ruler ». *Science (New York, N.Y.)* 302 (5651): 1757- 60. <https://doi.org/10.1126/science.1091422>.
- Justice, Sheryl S., Chia Hung, Julie A. Theriot, Daniel A. Fletcher, Gregory G. Anderson, Matthew J. Footer, et Scott J. Hultgren. 2004. « Differentiation and Developmental Pathways of Uropathogenic Escherichia Coli in Urinary Tract Pathogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (5): 1333- 38. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308125100>.
- Kagan, Jonathan C., et Craig R. Roy. 2002. « Legionella Phagosomes Intercept Vesicular Traffic from Endoplasmic Reticulum Exit Sites ». *Nature Cell Biology* 4 (12): 945- 54. <https://doi.org/10.1038/ncb883>.
- Kaspy, Ilana, Eitan Rotem, Noga Weiss, Irine Ronin, Nathalie Q. Balaban, et Gad Glaser. 2013. « HipA-Mediated Antibiotic Persistence via Phosphorylation of the Glutamyl-TRNA-Synthetase ». *Nature Communications* 4 (1): 1- 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms4001>.
- Kawano, Mitsuoki, L. Aravind, et Gisela Storz. 2007. « An Antisense RNA Controls Synthesis of an SOS-Induced Toxin Evolved from an Antitoxin ». *Molecular Microbiology* 64 (3): 738- 54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05688.x>.
- Kenney, Linda J. 2019. « The role of acid stress in Salmonella pathogenesis ». *Current Opinion in Microbiology, Host-microbe interactions: bacteria*, edited by Karen M. Ottemann & Linda J. Kenney, 47 (février): 45- 51. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.11.006>.
- Kim, Jisun, et Woojun Park. 2015. « Indole: A Signaling Molecule or a Mere Metabolic Byproduct That Alters Bacterial Physiology at a High Concentration? ». *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 53 (7): 421- 28. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-5273-3>.
- Kinchen, Jason M., et Kodi S. Ravichandran. 2008. « Phagosome Maturation: Going through the Acid Test ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (10): 781- 95. <https://doi.org/10.1038/nrm2515>.
- Klausen, Mikkel, Arne Heydorn, Paula Ragas, Lotte Lambertsen, Anders Aaes-Jørgensen, Søren Molin, et Tim Tolker-Nielsen. 2003. « Biofilm Formation by Pseudomonas Aeruginosa Wild Type, Flagella and Type IV Pili Mutants ». *Molecular Microbiology* 48 (6): 1511- 24. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03525.x>.

- Koh, Eun-Ik, Anne E. Robinson, Nilantha Bandara, Buck E. Rogers, et Jeffrey P. Henderson. 2017. « Copper Import in Escherichia Coli by the Yersiniabactin Metallophore System ». *Nature Chemical Biology* 13 (9): 1016- 21. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2441>.
- Koh, Kai Shyang, Kin Wai Lam, Morten Alhede, Shu Yeong Queck, Maurizio Labbate, Staffan Kjelleberg, et Scott A. Rice. 2007. « Phenotypic Diversification and Adaptation of Serratia Marcescens MG1 Biofilm-Derived Morphotypes ». *Journal of Bacteriology* 189 (1): 119- 30. <https://doi.org/10.1128/JB.00930-06>.
- Kolenbrander, Paul E. 2000. « Oral Microbial Communities: Biofilms, Interactions, and Genetic Systems ». *Annual Review of Microbiology* 54 (1): 413- 37. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.413>.
- Kolenda, Rafal, Maciej Ugorski, et Krzysztof Grzymajlo. 2019. « Everything You Always Wanted to Know About Salmonella Type 1 Fimbriae, but Were Afraid to Ask ». *Frontiers in Microbiology* 10 (mai). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01017>.
- Korch, Shaleen B., Thomas A. Henderson, et Thomas M. Hill. 2003. « Characterization of the HipA7 Allele of Escherichia Coli and Evidence That High Persistence Is Governed by (p)PpGpp Synthesis ». *Molecular Microbiology* 50 (4): 1199- 1213. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03779.x>.
- Kussell, Edo, Roy Kishony, Nathalie Q. Balaban, et Stanislas Leibler. 2005. « Bacterial Persistence: A Model of Survival in Changing Environments ». *Genetics* 169 (4): 1807- 14. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.035352>.
- Kvist, Malin, Viktoria Hancock, et Per Klemm. 2008. « Inactivation of Efflux Pumps Abolishes Bacterial Biofilm Formation ». *Applied and Environmental Microbiology* 74 (23): 7376- 82. <https://doi.org/10.1128/AEM.01310-08>.
- Kwan, David H., et Stephen G. Withers. 2014. « Periplasmic de-acylase helps bacteria don their biofilm coat ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (30): 10904- 5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410789111>.
- Kyei, George B., Isabelle Vergne, Jennifer Chua, Esteban Roberts, James Harris, Jagath R. Junutula, et Vojo Deretic. 2006. « Rab14 Is Critical for Maintenance of Mycobacterium Tuberculosis Phagosome Maturation Arrest ». *The EMBO Journal* 25 (22): 5250- 59. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601407>.
- Lapaquette, Pierre, Marie-Agnès Bringer, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2012. « Defects in Autophagy Favour Adherent-Invasive Escherichia Coli Persistence within Macrophages Leading to Increased pro-Inflammatory Response ». *Cellular Microbiology* 14 (6): 791- 807. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01768.x>.
- Lapaquette, Pierre, Anne-Lise Glasser, Alan Huett, Ramnik J. Xavier, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2010. « Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly ». *Cellular microbiology* 12 (1): 99- 113. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01381.x>.
- Latifi, A., M. Foglino, K. Tanaka, P. Williams, et A. Lazdunski. 1996. « A Hierarchical Quorum-Sensing Cascade in Pseudomonas Aeruginosa Links the Transcriptional Activators LasR and RhIR (VsmR) to Expression of the Stationary-Phase Sigma Factor RpoS ». *Molecular Microbiology* 21 (6): 1137- 46. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.00063.x>.
- Lease, R. A., et M. Belfort. 2000. « A Trans-Acting RNA as a Control Switch in Escherichia Coli: DsrA Modulates Function by Forming Alternative Structures ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (18): 9919- 24. <https://doi.org/10.1073/pnas.170281497>.
- Lebeaux, David, Jean-Marc Ghigo, et Christophe Beloin. 2014. « Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 78 (3): 510- 43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14>.
- Leid, Jeff G., Carey J. Willson, Mark E. Shirtliff, Daniel J. Hassett, Matthew R. Parsek, et Alyssa K. Jeffers. 2005. « The Exopolysaccharide Alginate Protects Pseudomonas Aeruginosa Biofilm

- Bacteria from IFN-Gamma-Mediated Macrophage Killing ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (11): 7512- 18. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7512>.
- Lennon, Jay T., et Stuart E. Jones. 2011. « Microbial Seed Banks: The Ecological and Evolutionary Implications of Dormancy ». *Nature Reviews Microbiology* 9 (2): 119- 30. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2504>.
- Leriche, V., P. Sibille, et B. Carpentier. 2000. « Use of an Enzyme-Linked Lectinsorbent Assay To Monitor the Shift in Polysaccharide Composition in Bacterial Biofilms ». *Applied and Environmental Microbiology* 66 (5): 1851- 56.
- Leung, Vincent, et Céline M. Lévesque. 2012. « A Stress-Inducible Quorum-Sensing Peptide Mediates the Formation of Persister Cells with Noninherited Multidrug Tolerance ». *Journal of Bacteriology* 194 (9): 2265- 74. <https://doi.org/10.1128/JB.06707-11>.
- Levin, Bruce R., Jeniffer Concepción-Acevedo, et Klas I. Udekwu. 2014. « Persistence: A Copacetic and Parsimonious Hypothesis for the Existence of Non-Inherited Resistance to Antibiotics ». *Current Opinion in Microbiology* 21 (octobre): 18- 21. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.06.016>.
- Levin-Reisman, Irit, Irine Ronin, Orit Gefen, Ilan Braniss, Noam Shoshani, et Nathalie Q. Balaban. 2017. « Antibiotic Tolerance Facilitates the Evolution of Resistance ». *Science (New York, N.Y.)* 355 (6327): 826- 30. <https://doi.org/10.1126/science.aaj2191>.
- Levy, S. B. 1992. « Active Efflux Mechanisms for Antimicrobial Resistance. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36 (4): 695- 703. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.4.695>.
- Lewis, Kim. 2007. « Persister Cells, Dormancy and Infectious Disease ». *Nature Reviews Microbiology* 5 (1): 48- 56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1557>.
- . 2010. « Persister Cells ». *Annual Review of Microbiology* 64 (1): 357- 72. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>.
- Li, S. R., N. Dorrell, P. H. Everest, G. Dougan, et B. W. Wren. 1996. « Construction and Characterization of a Yersinia Enterocolitica O:8 High-Temperature Requirement (HtrA) Isogenic Mutant ». *Infection and Immunity* 64 (6): 2088- 94.
- Li, Yung-Hua, et Xiaolin Tian. 2012. « Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms ». *Sensors (Basel, Switzerland)* 12 (3): 2519- 38. <https://doi.org/10.3390/s120302519>.
- Liao, Julie, Michael J. Schurr, et Karin Sauer. 2013. « The MerR-like Regulator BrIR Confers Biofilm Tolerance by Activating Multidrug Efflux Pumps in Pseudomonas Aeruginosa Biofilms ». *Journal of Bacteriology* 195 (15): 3352- 63. <https://doi.org/10.1128/JB.00318-13>.
- Limoli, Dominique H., Christopher J. Jones, et Daniel J. Wozniak. 2015. « Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function ». *Microbiology spectrum* 3 (3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014>.
- Lin, Jinshui, Weipeng Zhang, Juanli Cheng, Xu Yang, Kaixiang Zhu, Yao Wang, Gehong Wei, Pei-Yuan Qian, Zhao-Qing Luo, et Xihui Shen. 2017. « A Pseudomonas T6SS Effector Recruits PQS-Containing Outer Membrane Vesicles for Iron Acquisition ». *Nature Communications* 8 (1): 1- 12. <https://doi.org/10.1038/ncomms14888>.
- Lipinska, B., O. Fayet, L. Baird, et C. Georgopoulos. 1989. « Identification, Characterization, and Mapping of the Escherichia Coli HtrA Gene, Whose Product Is Essential for Bacterial Growth Only at Elevated Temperatures ». *Journal of Bacteriology* 171 (3): 1574- 84. <https://doi.org/10.1128/jb.171.3.1574-1584.1989>.
- Liss, Viktoria, A. Leoni Swart, Alexander Kehl, Natascha Hermanns, Yuying Zhang, Deepak Chikkaballi, Nathalie Böhles, Jörg Deiwick, et Michael Hensel. 2017. « Salmonella Enterica Remodels the Host Cell Endosomal System for Efficient Intravacuolar Nutrition ». *Cell Host & Microbe* 21 (3): 390- 402. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.02.005>.
- Liu, Hongyan, Weichao Bao, Mingqun Lin, Hua Niu, et Yasuko Rikihisa. 2012. « Ehrlichia type IV secretion effector ECH0825 is translocated to mitochondria and curbs ROS and apoptosis by upregulating host MnSOD ». *Cellular Microbiology* 14 (7): 1037- 50. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01775.x>.

- Liu, Zhen, Hua Niu, Shuyan Wu, et Rui Huang. 2014. « CsgD Regulatory Network in a Bacterial Trait-Altering Biofilm Formation ». *Emerging Microbes & Infections* 3 (1): e1. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.1>.
- López, Daniel, Hera Vlamakis, Richard Losick, et Roberto Kolter. 2009a. « Cannibalism Enhances Biofilm Development in *Bacillus Subtilis* ». *Molecular Microbiology* 74 (3): 609- 18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06882.x>.
- . 2009b. « Cannibalism Enhances Biofilm Development in *Bacillus Subtilis* ». *Molecular Microbiology* 74 (3): 609- 18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06882.x>.
- Lührmann, Anja, Hayley J. Newton, et Matteo Bonazzi. 2017. « Beginning to Understand the Role of the Type IV Secretion System Effector Proteins in *Coxiella Burnetii* Pathogenesis ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 413: 243- 68. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75241-9_10.
- Lyczak, Jeffrey B., Carolyn L. Cannon, et Gerald B. Pier. 2002. « Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis ». *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2): 194- 222. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.194-222.2002>.
- Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, et J. E. Hearst. 1995. « Genes *AcrA* and *AcrB* Encode a Stress-Induced Efflux System of *Escherichia Coli* ». *Molecular Microbiology* 16 (1): 45- 55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02390.x>.
- Ma, Luyan, Juan Wang, Shiwei Wang, Erin M. Anderson, Joseph S. Lam, Matthew R. Parsek, et Daniel J. Wozniak. 2012. « Synthesis of Multiple *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Matrix Exopolysaccharides Is Post-Transcriptionally Regulated ». *Environmental Microbiology* 14 (8): 1995- 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02753.x>.
- Macomber, Lee, et James A. Imlay. 2009. « The Iron-Sulfur Clusters of Dehydratases Are Primary Intracellular Targets of Copper Toxicity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (20): 8344- 49. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812808106>.
- Mah, T. F., et G. A. O'Toole. 2001. « Mechanisms of Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents ». *Trends in Microbiology* 9 (1): 34- 39.
- Majdalani, Nadim, et Susan Gottesman. 2005. « The Rcs Phosphorelay: A Complex Signal Transduction System ». *Annual Review of Microbiology* 59: 379- 405. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.050405.101230>.
- Majdalani, Nadim, David Hernandez, et Susan Gottesman. 2002. « Regulation and Mode of Action of the Second Small RNA Activator of RpoS Translation, RprA ». *Molecular Microbiology* 46 (3): 813- 26. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03203.x>.
- Mandin, Pierre, et Susan Gottesman. 2010. « Integrating anaerobic/aerobic sensing and the general stress response through the ArcZ small RNA ». *The EMBO Journal* 29 (18): 3094- 3107. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.179>.
- Mann, Elizabeth A., et Shehzad A. Saeed. 2012. « Gastrointestinal Infection as a Trigger for Inflammatory Bowel Disease ». *Current Opinion in Gastroenterology* 28 (1): 24- 29. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32834c453e>.
- Marks, Daniel J. B. 2011. « Defective Innate Immunity in Inflammatory Bowel Disease: A Crohn's Disease Exclusivity? ». *Current Opinion in Gastroenterology* 27 (4): 328- 34. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3283463b45>.
- Marques, Cláudia N. H., David G. Davies, et Karin Sauer. 2015. « Control of Biofilms with the Fatty Acid Signaling Molecule cis-2-Decenoic Acid ». *Pharmaceuticals* 8 (4): 816- 35. <https://doi.org/10.3390/ph8040816>.
- Martin, Helen M., Barry J. Campbell, C. Anthony Hart, Chiedzo Mpofo, Manu Nayar, Ravinder Singh, Hans Englyst, Helen F. Williams, et Jonathan M. Rhodes. 2004. « Enhanced *Escherichia Coli* Adherence and Invasion in Crohn's Disease and Colon Cancer 1 ». *Gastroenterology* 127 (1): 80- 93. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.03.054>.
- Martinez, Juan J., et Scott J. Hultgren. 2002. « Requirement of Rho-Family GTPases in the Invasion of Type 1-Piliated Uropathogenic *Escherichia Coli* ». *Cellular Microbiology* 4 (1): 19- 28. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00166.x>.

- Martinez-Medina, Margarita, Xavier Aldeguer, Mireia Lopez-Siles, Ferran González-Huix, Carles López-Oliu, Ghizlane Dahbi, Jesus E. Blanco, Jorge Blanco, L. Jesus Garcia-Gil, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2009. « Molecular Diversity of Escherichia Coli in the Human Gut: New Ecological Evidence Supporting the Role of Adherent-Invasive E. Coli (AIEC) in Crohn's Disease ». *Inflammatory Bowel Diseases* 15 (6): 872-82. <https://doi.org/10.1002/ibd.20860>.
- Martinez-Medina, Margarita, Azucena Mora, Miguel Blanco, Cecilia López, María Pilar Alonso, Stéphane Bonacorsi, Marie-Hélène Nicolas-Chanoine, Arlette Darfeuille-Michaud, Jesus Garcia-Gil, et Jorge Blanco. 2009. « Similarity and Divergence among Adherent-Invasive Escherichia coli and Extraintestinal Pathogenic E. coli Strains ». *Journal of Clinical Microbiology* 47 (12): 3968-79. <https://doi.org/10.1128/JCM.01484-09>.
- Martinez-Medina, Margarita, Plínio Naves, Jorge Blanco, Xavier Aldeguer, Jesus E Blanco, Miguel Blanco, Carmen Ponte, Francisco Soriano, Arlette Darfeuille-Michaud, et L Jesus Garcia-Gil. 2009. « Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive Escherichia coli (AIEC) ». *BMC Microbiology* 9 (septembre): 202. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-202>.
- Martino, P. Di, R. Fursy, L. Bret, B. Sundararaju, et R. S. Phillips. 2003. « Indole Can Act as an Extracellular Signal to Regulate Biofilm Formation of Escherichia Coli and Other Indole-Producing Bacteria ». *Canadian Journal of Microbiology* 49 (7): 443-49. <https://doi.org/10.1139/w03-056>.
- Massé, Eric, Hubert Salvail, Guillaume Desnoyers, et Mélina Arguin. 2007. « Small RNAs Controlling Iron Metabolism ». *Current Opinion in Microbiology* 10 (2): 140-45. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.03.013>.
- McBroom, Amanda J., et Meta J. Kuehn. 2007. « Release of Outer Membrane Vesicles by Gram-Negative Bacteria Is a Novel Envelope Stress Response ». *Molecular Microbiology* 63 (2): 545-58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x>.
- McEllistrem, M. Catherine, Jennifer V. Ransford, et Saleem A. Khan. 2007. « Characterization of in Vitro Biofilm-Associated Pneumococcal Phase Variants of a Clinically Relevant Serotype 3 Clone ». *Journal of Clinical Microbiology* 45 (1): 97-101. <https://doi.org/10.1128/JCM.01658-06>.
- McHugh, Jonathan P., Francisco Rodríguez-Quinoñes, Hossein Abdul-Tehrani, Dimitri A. Svistunenko, Robert K. Poole, Chris E. Cooper, et Simon C. Andrews. 2003. « Global Iron-Dependent Gene Regulation in Escherichia Coli. A New Mechanism for Iron Homeostasis ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (32): 29478-86. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303381200>.
- McKenney, D., J. Hübner, E. Muller, Y. Wang, D. A. Goldmann, et G. B. Pier. 1998. « The Ica Locus of Staphylococcus Epidermidis Encodes Production of the Capsular Polysaccharide/Adhesin ». *Infection and Immunity* 66 (10): 4711-20.
- McNeill, Karol, et I. R. Hamilton. 2003. « Acid tolerance response of biofilm cells of Streptococcus mutans ». *FEMS Microbiology Letters* 221 (1): 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00164-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00164-2).
- Medzhitov, Ruslan. 2007. « Recognition of Microorganisms and Activation of the Immune Response ». *Nature* 449 (7164): 819-26. <https://doi.org/10.1038/nature06246>.
- Miao, Edward A., Irina A. Leaf, Piper M. Treuting, Dat P. Mao, Monica Dors, Anasuya Sarkar, Sarah E. Warren, Mark D. Wewers, et Alan Aderem. 2010. « Caspase-1-Induced Pyroptosis Is an Innate Immune Effector Mechanism against Intracellular Bacteria ». *Nature Immunology* 11 (12): 1136-42. <https://doi.org/10.1038/ni.1960>.
- Michiels, T., P. Wattiau, R. Brasseur, J. M. Ruyschaert, et G. Cornelis. 1990. « Secretion of Yop Proteins by Yersiniae ». *Infection and Immunity* 58 (9): 2840-49.
- Miethke, Marcus, et Mohamed A. Marahiel. 2007. « Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 71 (3): 413-51. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>.
- Mika, Franziska, et Regine Hengge. 2013. « Small Regulatory RNAs in the Control of Motility and Biofilm Formation in E. Coli and Salmonella ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (3): 4560-79. <https://doi.org/10.3390/ijms14034560>.

- . 2014. « Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of *Escherichia coli* ». *RNA Biology* 11 (5): 494- 507. <https://doi.org/10.4161/rna.28867>.
- Miki, Tsuyoshi, Nobuhiko Okada, Yeongsuk Kim, Akio Abe, et Hirofumi Danbara. 2008. « DsbA Directs Efficient Expression of Outer Membrane Secretin EscC of the Enteropathogenic *Escherichia Coli* Type III Secretion Apparatus ». *Microbial Pathogenesis* 44 (2): 151- 58. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.09.001>.
- Miquel, Sylvie, Laurent Claret, Richard Bonnet, Imen Dorboz, Nicolas Barnich, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2010. « Role of Decreased Levels of Fis Histone-like Protein in Crohn's Disease-Associated Adherent Invasive *Escherichia Coli* LF82 Bacteria Interacting with Intestinal Epithelial Cells ». *Journal of Bacteriology* 192 (7): 1832- 43. <https://doi.org/10.1128/JB.01679-09>.
- Miquel, Sylvie, Eric Peyretailade, Laurent Claret, Amélie de Vallée, Carole Dossat, Benoit Vacherie, El Hajji Zineb, et al. 2010a. « Complete Genome Sequence of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *E. coli* Strain LF82 ». *PLoS ONE* 5 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012714>.
- . 2010b. « Complete Genome Sequence of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *E. coli* Strain LF82 ». *PloS One* 5 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012714>.
- Mitchell, Gabriel, Chen Chen, et Daniel A. Portnoy. 2016. « Strategies used by bacteria to grow in macrophages ». *Microbiology spectrum* 4 (3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0012-2015>.
- Möker, Nina, Charles R. Dean, et Jianshi Tao. 2010. « *Pseudomonas Aeruginosa* Increases Formation of Multidrug-Tolerant Persister Cells in Response to Quorum-Sensing Signaling Molecules ». *Journal of Bacteriology* 192 (7): 1946- 55. <https://doi.org/10.1128/JB.01231-09>.
- Molmeret, Maëlle, Matthias Horn, Michael Wagner, Marina Santic, et Yousef Abu Kwaik. 2005. « Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens ». *Applied and Environmental Microbiology* 71 (1): 20- 28. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.20-28.2005>.
- Moscoso, Joana A., Helga Mikkelsen, Stephan Heeb, Paul Williams, et Alain Filloux. 2011. « The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches Type III and Type VI secretion via c-di-GMP signalling ». *Environmental Microbiology* 13 (12): 3128- 38. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02595.x>.
- Moser, C., S. Kjaergaard, T. Pressler, A. Kharazmi, C. Koch, et N. Høiby. 2000. « The Immune Response to Chronic *Pseudomonas Aeruginosa* Lung Infection in Cystic Fibrosis Patients Is Predominantly of the Th2 Type ». *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 108 (5): 329- 35. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2000.d01-64.x>.
- Motta, Jean-Paul, Thibault Allain, Luke E Green-Harrison, Ryan A Groves, Troy Feener, Hena Ramay, Paul L Beck, Ian A Lewis, John L Wallace, et Andre G Buret. 2018. « Iron Sequestration in Microbiota Biofilms As A Novel Strategy for Treating Inflammatory Bowel Disease ». *Inflammatory Bowel Diseases* 24 (7): 1493- 1502. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy116>.
- Mouton, Jacoba M., Sophie Helaine, David W. Holden, et Samantha L. Sampson. 2016. « Elucidating population-wide mycobacterial replication dynamics at the single-cell level ». *Microbiology* 162 (6): 966- 78. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000288>.
- Mrakovic, Amra, Jason G. Kay, Wendy Furuya, John H. Brumell, et Roberto J. Botelho. 2012. « Rab7 and Arl8 GTPases are Necessary for Lysosome Tubulation in Macrophages ». *Traffic* 13 (12): 1667- 79. <https://doi.org/10.1111/tra.12003>.
- Mulvey, Matthew A. 2002. « Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli* ». *Cellular Microbiology* 4 (5): 257- 71. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00193.x>.
- Mulvey, Matthew A., Joel D. Schilling, et Scott J. Hultgren. 2001. « Establishment of a Persistent *Escherichia Coli* Reservoir during the Acute Phase of a Bladder Infection ». *Infection and Immunity* 69 (7): 4572- 79. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4572-4579.2001>.
- Murashko, Oleg N., et Sue Lin-Chao. 2017. « *Escherichia coli* responds to environmental changes using enolase degradosomes and stabilized DicF sRNA to alter cellular morphology ».

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (38): E8025-34. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703731114>.
- Mysorekar, Indira U., et Scott J. Hultgren. 2006. « Mechanisms of Uropathogenic Escherichia Coli Persistence and Eradication from the Urinary Tract ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (38): 14170-75. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602136103>.
- Nagao-Kitamoto, Hiroko, Sho Kitamoto, Peter Kuffa, et Nobuhiko Kamada. 2016. « Pathogenic Role of the Gut Microbiota in Gastrointestinal Diseases ». *Intestinal Research* 14 (2): 127-38. <https://doi.org/10.5217/ir.2016.14.2.127>.
- Nairz, Manfred, David Haschka, Egon Demetz, et Günter Weiss. 2014. « Iron at the interface of immunity and infection ». *Frontiers in Pharmacology* 5 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00152>.
- Nash, John HE, Andre Villegas, Andrew M Kropinski, Renan Aguilar-Valenzuela, Paulina Konczyk, Mariola Mascarenhas, Kim Ziebell, Alfredo G Torres, Mohamed A Karmali, et Brian K Coombes. 2010. « Genome sequence of adherent-invasive Escherichia coli and comparative genomic analysis with other E. coli pathotypes ». *BMC Genomics* 11 (novembre): 667. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-667>.
- Nash, John He, Andre Villegas, Andrew M. Kropinski, Renan Aguilar-Valenzuela, Paulina Konczyk, Mariola Mascarenhas, Kim Ziebell, Alfredo G. Torres, Mohamed A. Karmali, et Brian K. Coombes. 2010. « Genome Sequence of Adherent-Invasive Escherichia Coli and Comparative Genomic Analysis with Other E. Coli Pathotypes ». *BMC Genomics* 11 (novembre): 667. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-667>.
- Negróni, Anna, Maria Pierdomenico, Salvatore Cucchiara, et Laura Stronati. 2018. « NOD2 and inflammation: current insights ». *Journal of Inflammation Research* 11 (février): 49-60. <https://doi.org/10.2147/JIR.S137606>.
- Nguyen, Dao, et Pradeep K. Singh. 2006. « Evolving Stealth: Genetic Adaptation of Pseudomonas Aeruginosa during Cystic Fibrosis Infections ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (22): 8305-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602526103>.
- Nguyen, Hang Thi Thu, Guillaume Dalmasso, Stefan Müller, Jessica Carrière, Frank Seibold, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2014. « Crohn's Disease-Associated Adherent Invasive Escherichia Coli Modulate Levels of MicroRNAs in Intestinal Epithelial Cells to Reduce Autophagy ». *Gastroenterology* 146 (2): 508-19. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.021>.
- Noto, Jennifer M., et Richard M. Peek. 2011. « The Role of MicroRNAs in Helicobacter Pylori Pathogenesis and Gastric Carcinogenesis ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 1: 21. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2011.00021>.
- O'Brien, Claire L., Marie-Agnès Bringer, Kathryn E. Holt, David M. Gordon, Anaëlle L. Dubois, Nicolas Barnich, Arlette Darfeuille-Michaud, et Paul Pavli. 2017. « Comparative Genomics of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia Coli ». *Gut* 66 (8): 1382-89. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-311059>.
- Ogasawara, Hiroshi, Kaneyoshi Yamamoto, et Akira Ishihama. 2011. « Role of the Biofilm Master Regulator CsgD in Cross-Regulation between Biofilm Formation and Flagellar Synthesis ». *Journal of Bacteriology* 193 (10): 2587-97. <https://doi.org/10.1128/JB.01468-10>.
- Ogura, Yasunori, Naohiro Inohara, Adalberto Benito, Felicia F. Chen, Shoji Yamaoka, et Gabriel Núñez. 2001. « Nod2, a Nod1/Apaf-1 Family Member That Is Restricted to Monocytes and Activates NF-KB ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (7): 4812-18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008072200>.
- Olsén, A., A. Arnvist, M. Hammar, S. Sukupolvi, et S. Normark. 1993. « The RpoS Sigma Factor Relieves H-NS-Mediated Transcriptional Repression of CsgA, the Subunit Gene of Fibronectin-Binding Curli in Escherichia Coli ». *Molecular Microbiology* 7 (4): 523-36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01143.x>.

- Orman, Mehmet A., et Mark P. Brynildsen. 2013. « Dormancy Is Not Necessary or Sufficient for Bacterial Persistence ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (7): 3230- 39. <https://doi.org/10.1128/AAC.00243-13>.
- Otto, M. 2006. « Bacterial Evasion of Antimicrobial Peptides by Biofilm Formation ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 306: 251- 58. https://doi.org/10.1007/3-540-29916-5_10.
- Paauw, Armand, Maurine A. Leverstein-van Hall, Kok P. M. van Kessel, Jan Verhoef, et Ad C. Fluit. 2009. « Yersiniabactin Reduces the Respiratory Oxidative Stress Response of Innate Immune Cells ». *PLoS One* 4 (12): e8240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008240>.
- Pace, Fernanda de, Jacqueline Boldrin de Paiva, Gerson Nakazato, Marcelo Lancellotti, Marcelo Palma Sircili, Eliana Guedes Stehling, Wanderley Dias da Silveira, et Vanessa Sperandio. 2011. « Characterization of IcmF of the type VI secretion system in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain ». *Microbiology* 157 (Pt 10): 2954- 62. <https://doi.org/10.1099/mic.0.050005-0>.
- Palmer, Kelli L., Lindsay M. Aye, et Marvin Whiteley. 2007. « Nutritional Cues Control *Pseudomonas Aeruginosa* Multicellular Behavior in Cystic Fibrosis Sputum ». *Journal of Bacteriology* 189 (22): 8079- 87. <https://doi.org/10.1128/JB.01138-07>.
- Park, Sungsu, Peter M. Wolanin, Emil A. Yuzbashyan, Pascal Silberzan, Jeffrey B. Stock, et Robert H. Austin. 2003. « Motion to Form a Quorum ». *Science* 301 (5630): 188- 188. <https://doi.org/10.1126/science.1079805>.
- Park, Young-Jun, Kaitlyn D. Lacourse, Christian Cambillau, Frank DiMaio, Joseph D. Mougous, et David Veesler. 2018. « Structure of the Type VI Secretion System TssK–TssF–TssG Baseplate Subcomplex Revealed by Cryo-Electron Microscopy ». *Nature Communications* 9 (1): 1- 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07796-5>.
- Parkhill, J., G. Dougan, K. D. James, N. R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, et al. 2001. « Complete Genome Sequence of a Multiple Drug Resistant *Salmonella Enterica* Serovar Typhi CT18 ». *Nature* 413 (6858): 848- 52. <https://doi.org/10.1038/35101607>.
- Parsek, Matthew R., et Pradeep K. Singh. 2003. « Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis ». *Annual Review of Microbiology* 57: 677- 701. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090720>.
- Pedersen, L. L., M. Radulic, M. Doric, et Y. Abu Kwaik. 2001. « HtrA Homologue of *Legionella Pneumophila*: An Indispensable Element for Intracellular Infection of Mammalian but Not Protozoan Cells ». *Infection and Immunity* 69 (4): 2569- 79. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2569-2579.2001>.
- Petnicki-Ocwieja, Tanja, Tomas Hrcir, Yuen-Joyce Liu, Amlan Biswas, Tomas Hudcovic, Helena Tlaskalova-Hogenova, et Koichi S. Kobayashi. 2009. « Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (37): 15813- 18. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907722106>.
- Price, Jordan V., et Russell E. Vance. 2014. « The Macrophage Paradox ». *Immunity* 41 (5): 685- 93. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.015>.
- Prigent-Combaret, C., G. Prensier, T. T. Le Thi, O. Vidal, P. Lejeune, et C. Dorel. 2000. « Developmental Pathway for Biofilm Formation in Curli-Producing *Escherichia Coli* Strains: Role of Flagella, Curli and Colanic Acid ». *Environmental Microbiology* 2 (4): 450- 64.
- Pukatzki, Stefan, Amy T. Ma, Andrew T. Revel, Derek Sturtevant, et John J. Mekalanos. 2007. « Type VI Secretion System Translocates a Phage Tail Spike-like Protein into Target Cells Where It Cross-Links Actin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (39): 15508- 13. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706532104>.
- Purcell, M., et H. A. Shuman. 1998. « The *Legionella Pneumophila* IcmGCDJBF Genes Are Required for Killing of Human Macrophages ». *Infection and Immunity* 66 (5): 2245- 55.
- Purdy, Georgiana E., Mei Hong, et Shelley M. Payne. 2002. « *Shigella Flexneri* DegP Facilitates IcsA Surface Expression and Is Required for Efficient Intercellular Spread ». *Infection and Immunity* 70 (11): 6355- 64. <https://doi.org/10.1128/iai.70.11.6355-6364.2002>.

- Qin, Junjie, Ruiqiang Li, Jeroen Raes, Manimozhiyan Arumugam, Kristoffer Solvsten Burgdorf, Chaysavanh Manichanh, Trine Nielsen, et al. 2010. « A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing ». *Nature* 464 (7285): 59- 65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>.
- Quiros, Miguel, Hikaru Nishio, Philipp A. Neumann, Dorothee Siuda, Jennifer C. Brazil, Veronica Azcutia, Roland Hilgarth, et al. s. d. « Macrophage-derived IL-10 mediates mucosal repair by epithelial WISP-1 signaling ». *The Journal of Clinical Investigation* 127 (9): 3510- 20. <https://doi.org/10.1172/JCI90229>.
- Rahighi, Simin, Fumiyo Ikeda, Masato Kawasaki, Masato Akutsu, Nobuhiro Suzuki, Ryuichi Kato, Tobias Kensche, et al. 2009. « Specific Recognition of Linear Ubiquitin Chains by NEMO Is Important for NF-KB Activation ». *Cell* 136 (6): 1098- 1109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.007>.
- Rajaram, Murugesan V. S., Michelle N. Brooks, Jessica D. Morris, Jordi B. Torrelles, Abul K. Azad, et Larry S. Schlesinger. 2010. « Mycobacterium Tuberculosis Activates Human Macrophage Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Linking Mannose Receptor Recognition to Regulation of Immune Responses ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (2): 929- 42. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000866>.
- Rajilić-Stojanović, Mirjana, Hans G. H. J. Heilig, Sebastian Tims, Erwin G. Zoetendal, et Willem M. de Vos. 2012. « Long-Term Monitoring of the Human Intestinal Microbiota Composition ». *Environmental Microbiology*, octobre. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12023>.
- Rao, P. S. Srinivasa, Yoshiyuki Yamada, Yuen Peng Tan, et Ka Yin Leung. 2004. « Use of Proteomics to Identify Novel Virulence Determinants That Are Required for Edwardsiella Tarda Pathogenesis ». *Molecular Microbiology* 53 (2): 573- 86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04123.x>.
- Rapisarda, Chiara, et Rémi Fronzes. 2018. « Secretion Systems Used by Bacteria to Subvert Host Functions ». *Current Issues in Molecular Biology* 25: 1- 42. <https://doi.org/10.21775/cimb.025.001>.
- Reigstad, Christopher S., Scott J. Hultgren, et Jeffrey I. Gordon. 2007. « Functional Genomic Studies of Uropathogenic Escherichia Coli and Host Urothelial Cells When Intracellular Bacterial Communities Are Assembled ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (29): 21259- 67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611502200>.
- Reinoso Webb, Cynthia, Iurii Kobozev, Kathryn L. Furr, et Matthew B. Grisham. 2016. « Protective and Pro-Inflammatory Roles of Intestinal Bacteria ». *Pathophysiology: The Official Journal of the International Society for Pathophysiology* 23 (2): 67- 80. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2016.02.002>.
- Rhen, Mikael, Sofia Eriksson, Mark Clements, Sven Bergström, et Staffan J. Normark. 2003. « The Basis of Persistent Bacterial Infections ». *Trends in Microbiology* 11 (2): 80- 86. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(02\)00038-0](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(02)00038-0).
- Richards, Vincent P., Tristan Lefébure, Paulina D. Pavinski Bitar, Belgin Dogan, Kenneth W. Simpson, Ynte H. Schukken, et Michael J. Stanhope. 2015. « Genome Based Phylogeny and Comparative Genomic Analysis of Intra-Mammary Pathogenic Escherichia Coli ». *PLOS ONE* 10 (3): e0119799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119799>.
- Rivas, Manuel A., Melissa Beaudoin, Agnes Gardet, Christine Stevens, Yashoda Sharma, Clarence K. Zhang, Gabrielle Boucher, et al. 2011. « Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease ». *Nature genetics* 43 (11): 1066- 73. <https://doi.org/10.1038/ng.952>.
- Robinson, Anne E., Jessica E. Lowe, Eun-Ik Koh, et Jeffrey P. Henderson. 2018. « Uropathogenic Enterobacteria Use the Yersiniabactin Metallophore System to Acquire Nickel ». *The Journal of Biological Chemistry* 293 (39): 14953- 61. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004483>.
- Rolhion, Nathalie, Nicolas Barnich, Laurent Claret, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2005. « Strong Decrease in Invasive Ability and Outer Membrane Vesicle Release in Crohn's Disease-

- Associated Adherent-Invasive Escherichia Coli Strain LF82 with the YfgL Gene Deleted ». *Journal of Bacteriology* 187 (7): 2286- 96. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2286-2296.2005>.
- Rolhion, Nathalie, Frédéric Antonio Carvalho, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2007. « OmpC and the Σ E Regulatory Pathway Are Involved in Adhesion and Invasion of the Crohn's Disease-Associated Escherichia Coli Strain LF82 ». *Molecular Microbiology* 63 (6): 1684- 1700. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05638.x>.
- Rolhion, Nathalie, Paul Hofman, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2011. « The endoplasmic reticulum stress response chaperone Gp96, a host receptor for Crohn disease-associated adherent-invasive Escherichia coli ». *Gut Microbes* 2 (2): 115- 19. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.2.15725>.
- Römling, Ute, Michael Y. Galperin, et Mark Gomelsky. 2013. « Cyclic Di-GMP: The First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 77 (1): 1- 52. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00043-12>.
- Römling, Ute, Mark Gomelsky, et Michael Y. Galperin. 2005. « C-Di-GMP: The Dawning of a Novel Bacterial Signalling System ». *Molecular Microbiology* 57 (3): 629- 39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04697.x>.
- Ronneau, Séverin, et Sophie Helaine. 2019. « Clarifying the Link between Toxin–Antitoxin Modules and Bacterial Persistence ». *Journal of Molecular Biology, The molecular basis of antibiotic action and resistance*, 431 (18): 3462- 71. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.03.019>.
- Rosales, Carlos, et Eileen Uribe-Querol. 2017. « Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity ». *BioMed Research International* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9042851>.
- Rosen, David A., Thomas M. Hooton, Walter E. Stamm, Peter A. Humphrey, et Scott J. Hultgren. 2007. « Detection of Intracellular Bacterial Communities in Human Urinary Tract Infection ». *Plos Medicine* 4 (12): 1949- 58. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040329>.
- Rosenstiel, Philip, Massimo Fantini, Karen Bräutigam, Tanja Kühbacher, Georg H. Waetzig, Dirk Seegert, et Stefan Schreiber. 2003. « TNF-Alpha and IFN-Gamma Regulate the Expression of the NOD2 (CARD15) Gene in Human Intestinal Epithelial Cells ». *Gastroenterology* 124 (4): 1001- 9. <https://doi.org/10.1053/gast.2003.50157>.
- Ross, J. I., E. A. Eady, J. H. Cove, W. J. Cunliffe, S. Baumberg, et J. C. Wootton. 1990. « Inducible Erythromycin Resistance in Staphylococci Is Encoded by a Member of the ATP-Binding Transport Super-Gene Family ». *Molecular Microbiology* 4 (7): 1207- 14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00696.x>.
- Rotem, Eitan, Adiel Loinger, Irine Ronin, Irit Levin-Reisman, Chana Gabay, Noam Shoshitaishvili, Ofer Biham, et Nathalie Q. Balaban. 2010. « Regulation of Phenotypic Variability by a Threshold-Based Mechanism Underlies Bacterial Persistence ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (28): 12541- 46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004333107>.
- Rugtveit, J, P Brandtzaeg, T S Halstensen, O Fausa, et H Scott. 1994. « Increased macrophage subset in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes. » *Gut* 35 (5): 669- 74.
- Ryan, P, M W Bennett, S Aarons, G Lee, J K Collins, G C O'Sullivan, J O'Connell, et F Shanahan. 2002. « PCR detection of Mycobacterium paratuberculosis in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection ». *Gut* 51 (5): 665- 70.
- Saha, Ratul, Nabaneeta Saha, Robert S. Donofrio, et Lorelle L. Bestervelt. 2013. « Microbial siderophores: a mini review ». *Journal of Basic Microbiology* 53 (4): 303- 17. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100552>.
- Salcedo, Suzana P., et David W. Holden. 2003. « SseG, a virulence protein that targets Salmonella to the Golgi network ». *The EMBO Journal* 22 (19): 5003- 14. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg517>.
- Sandoz, Kelsi M., Paul A. Beare, Diane C. Cockrell, et Robert A. Heinzen. 2016. « Complementation of Arginine Auxotrophy for Genetic Transformation of Coxiella Burnetii by Use of a Defined Axenic Medium ». *Applied and Environmental Microbiology* 82 (10): 3042- 51. <https://doi.org/10.1128/AEM.00261-16>.

- Saqib, Uzma, Sutripta Sarkar, Kyoungso Suk, Owais Mohammad, Mirza S. Baig, et Rajkumar Savai. 2018. « Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation ». *Oncotarget* 9 (25): 17937- 50. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24788>.
- Saric, Amra, Victoria E. B. Hipolito, Jason G. Kay, Johnathan Canton, Costin N. Antonescu, et Roberto J. Botelho. 2016. « mTOR controls lysosome tubulation and antigen presentation in macrophages and dendritic cells ». *Molecular Biology of the Cell* 27 (2): 321- 33. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-05-0272>.
- Sasaki, Maiko, Shanti V. Sitaraman, Brian A. Babbitt, Peter Gerner-Smidt, Efrain M. Ribot, Nancy Garrett, Joel A. Alpern, et al. 2007. « Invasive Escherichia Coli Are a Feature of Crohn's Disease ». *Laboratory Investigation* 87 (10): 1042- 54. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700661>.
- Schilling, Joel D., Matthew A. Mulvey, et Scott J. Hultgren. 2001. « Structure and Function of Escherichia coli Type 1 Pili: New Insight into the Pathogenesis of Urinary Tract Infections ». *The Journal of Infectious Diseases* 183 (Supplement_1): S36- 40. <https://doi.org/10.1086/318855>.
- Schmidt, Thomas S. B., Jeroen Raes, et Peer Bork. 2018. « The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation ». *Cell* 172 (6): 1198- 1215. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.044>.
- Schoemaker, J. M., R. C. Gayda, et A. Markovitz. 1984. « Regulation of Cell Division in Escherichia Coli: SOS Induction and Cellular Location of the SulA Protein, a Key to Lon-Associated Filamentation and Death ». *Journal of Bacteriology* 158 (2): 551- 61.
- Schroeder, Gunnar N., et Hubert Hilbi. 2008. « Molecular Pathogenesis of Shigella Spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion ». *Clinical Microbiology Reviews* 21 (1): 134- 56. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-07>.
- Schultsz, C, M Moussa, R van Ketel, G N Tytgat, et J Dankert. 1997. « Frequency of pathogenic and enteroadherent Escherichia coli in patients with inflammatory bowel disease and controls. » *Journal of Clinical Pathology* 50 (7): 573- 79.
- Schumacher, Maria A., Pooja Balani, Jungki Min, Naga Babu Chinnam, Sonja Hansen, Marin Vulić, Kim Lewis, et Richard G. Brennan. 2015. « HipBA-Promoter Structures Reveal the Basis of Heritable Multidrug Tolerance ». *Nature* 524 (7563): 59- 64. <https://doi.org/10.1038/nature14662>.
- Schwechheimer, Carmen, et Meta J. Kuehn. 2015. « Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions ». *Nature reviews. Microbiology* 13 (10): 605- 19. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3525>.
- Scott, Victoria C. S., David A. Haake, Bernard M. Churchill, Sheryl S. Justice, et Ja-Hong Kim. 2015. « Intracellular Bacterial Communities: A Potential Etiology for Chronic Lower Urinary Tract Symptoms ». *Urology* 86 (3): 425- 31. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2015.04.002>.
- Sebastián Domingo, Juan José, et Clara Sánchez Sánchez. 2018. « From the Intestinal Flora to the Microbiome ». *Revista Espanola De Enfermedades Digestivas: Organo Oficial De La Sociedad Espanola De Patologia Digestiva* 110 (1): 51- 56. <https://doi.org/10.17235/reed.2017.4947/2017>.
- Seo, Sang Woo, Donghyuk Kim, Haythem Latif, Edward J. O'Brien, Richard Szubin, et Bernhard O. Palsson. 2014. « Deciphering Fur Transcriptional Regulatory Network Highlights Its Complex Role beyond Iron Metabolism in Escherichia Coli ». *Nature Communications* 5 (septembre): 4910. <https://doi.org/10.1038/ncomms5910>.
- Serra, Diego O., Anja M. Richter, et Regine Hengge. 2013. « Cellulose as an Architectural Element in Spatially Structured Escherichia Coli Biofilms ». *Journal of Bacteriology* 195 (24): 5540- 54. <https://doi.org/10.1128/JB.00946-13>.
- Serra, Diego O., Anja M. Richter, Gisela Klauk, Franziska Mika, et Regine Hengge. 2013. « Microanatomy at Cellular Resolution and Spatial Order of Physiological Differentiation in a Bacterial Biofilm ». *mBio* 4 (2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00103-13>.

- Seviour, Thomas, Nicolas Derlon, Morten Simonsen Dueholm, Hans-Curt Flemming, Elisabeth Girbal-Neuhausser, Harald Horn, Staffan Kjelleberg, et al. 2019. « Extracellular polymeric substances of biofilms: Suffering from an identity crisis ». *Water Research* 151 (mars): 1 - 7. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.020>.
- Shaler, Christopher R., Wael Elhenawy, et Brian K. Coombes. 2019. « The Unique Lifestyle of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia Coli ». *Journal of Molecular Biology* 431 (16): 2970- 81. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.023>.
- Shan, Yue, Autumn Brown Gandt, Sarah E. Rowe, Julia P. Deisinger, Brian P. Conlon, et Kim Lewis. 2017. « ATP-Dependent Persister Formation in Escherichia Coli ». *MBio* 8 (1): e02267-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.02267-16>.
- Sharahi, Javad Yasbolaghi, Taher Azimi, Aref Shariati, Hossein Safari, Melika Khanzadeh Tehrani, et Ali Hashemi. 2019. « Advanced Strategies for Combating Bacterial Biofilms ». *Journal of Cellular Physiology* 234 (9): 14689- 708. <https://doi.org/10.1002/jcp.28225>.
- Shirey, Kari Ann, Leah E. Cole, Achsa D. Keegan, et Stefanie N. Vogel. 2008. « Francisella Tularensis Live Vaccine Strain Induces Macrophage Alternative Activation as a Survival Mechanism ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (6): 4159- 67. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.4159>.
- Sidiq, Tabasum, Sayuri Yoshihama, Isaac Downs, et Koichi S. Kobayashi. 2016. « Nod2: A Critical Regulator of Ileal Microbiota and Crohn's Disease ». *Frontiers in Immunology* 7 (septembre). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00367>.
- Silhavy, Thomas J., Daniel Kahne, et Suzanne Walker. 2010. « The Bacterial Cell Envelope ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (5): a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>.
- Simm, Roger, Michael Morr, Abdul Kader, Manfred Nimtz, et Ute Römling. 2004. « GGDEF and EAL Domains Inversely Regulate Cyclic Di-GMP Levels and Transition from Sessility to Motility ». *Molecular Microbiology* 53 (4): 1123- 34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04206.x>.
- Singh, Pradeep K., Matthew R. Parsek, E. Peter Greenberg, et Michael J. Welsh. 2002. « A Component of Innate Immunity Prevents Bacterial Biofilm Development ». *Nature* 417 (6888): 552- 55. <https://doi.org/10.1038/417552a>.
- Singleton, Larissa A., Janet L. Gibson, Elizabeth J. Tanner, Gregory J. McKenzie, Peter L. Lee, Caleb Gonzalez, et Susan M. Rosenberg. 2009. « An SOS-Regulated Type 2 Toxin-Antitoxin System ». *Journal of Bacteriology* 191 (24): 7456- 65. <https://doi.org/10.1128/JB.00963-09>.
- Skaar, Eric P. 2010. « The Battle for Iron between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts ». *PLoS Pathogens* 6 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000949>.
- Skerrett, S. J., et T. R. Martin. 1996. « Roles for Tumor Necrosis Factor Alpha and Nitric Oxide in Resistance of Rat Alveolar Macrophages to Legionella Pneumophila ». *Infection and Immunity* 64 (8): 3236- 43.
- Smythies, Lesley E., Marty Sellers, Ronald H. Clements, Meg Mosteller-Barnum, Gang Meng, William H. Benjamin, Jan M. Orenstein, et Phillip D. Smith. 2005. « Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity ». *Journal of Clinical Investigation* 115 (1): 66- 75. <https://doi.org/10.1172/JCI200519229>.
- Snyder, Jennifer A., Brian J. Haugen, Eric L. Buckles, C. Virginia Lockett, David E. Johnson, Michael S. Donnenberg, Rodney A. Welch, et Harry L. T. Mobley. 2004. « Transcriptome of Uropathogenic Escherichia coli during Urinary Tract Infection ». *Infection and Immunity* 72 (11): 6373- 81. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.11.6373-6381.2004>.
- Southey-Pillig, Christopher J., David G. Davies, et Karin Sauer. 2005. « Characterization of Temporal Protein Production in Pseudomonas Aeruginosa Biofilms ». *Journal of Bacteriology* 187 (23): 8114- 26. <https://doi.org/10.1128/JB.187.23.8114-8126.2005>.
- Srivatsan, Anjana, et Jue D. Wang. 2008. « Control of Bacterial Transcription, Translation and Replication by (p)PpGpp ». *Current Opinion in Microbiology* 11 (2): 100- 105. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.001>.

- Stapels, Daphne A. C., Peter W. S. Hill, Alexander J. Westermann, Robert A. Fisher, Teresa L. Thurston, Antoine-Emmanuel Saliba, Isabelle Blommestein, Jörg Vogel, et Sophie Helaine. 2018. « Salmonella Persists Undermine Host Immune Defenses during Antibiotic Treatment ». *Science (New York, N.Y.)* 362 (6419): 1156- 60. <https://doi.org/10.1126/science.aat7148>.
- Stevenson, Taylor C., Colette Cywes-Bentley, Tyler D. Moeller, Kevin B. Weyant, David Putnam, Yung-Fu Chang, Bradley D. Jones, Gerald B. Pier, et Matthew P. DeLisa. 2018. « Immunization with Outer Membrane Vesicles Displaying Conserved Surface Polysaccharide Antigen Elicits Broadly Antimicrobial Antibodies ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (14): E3106- 15. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718341115>.
- Stewart, Balint, et Daniel E. Rozen. 2012. « Genetic Variation for Antibiotic Persistence in Escherichia Coli ». *Evolution* 66 (3): 933- 39. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01467.x>.
- Stewart, Philip S. 2003. « Diffusion in Biofilms ». *Journal of Bacteriology* 185 (5): 1485- 91. <https://doi.org/10.1128/JB.185.5.1485-1491.2003>.
- Stewart, Philip S., et Michael J. Franklin. 2008. « Physiological Heterogeneity in Biofilms ». *Nature Reviews Microbiology* 6 (3): 199- 210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>.
- Strober, Warren, Ivan Fuss, et Peter Mannon. 2007. « The fundamental basis of inflammatory bowel disease ». *Journal of Clinical Investigation* 117 (3): 514- 21. <https://doi.org/10.1172/JCI30587>.
- Strober, Warren, et Tomohiro Watanabe. 2011. « NOD2, an Intracellular Innate Immune Sensor Involved in Host Defense and Crohn's Disease ». *Mucosal immunology* 4 (5): 484- 95. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.29>.
- Suarez, Giovanni, Johanna C. Sierra, Jian Sha, Shaofei Wang, Tatiana E. Erova, Amin A. Fadl, Sheri M. Foltz, Amy J. Horneman, et Ashok K. Chopra. 2008. « Molecular Characterization of a Functional Type VI Secretion System from a Clinical Isolate of *Aeromonas Hydrophila* ». *Microbial Pathogenesis* 44 (4): 344- 61. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.10.005>.
- Sun-Wada, Ge-Hong, Hiroyuki Tabata, Nobuyuki Kawamura, Minako Aoyama, et Yoh Wada. 2009. « Direct Recruitment of H⁺-ATPase from Lysosomes for Phagosomal Acidification ». *Journal of Cell Science* 122 (14): 2504- 13. <https://doi.org/10.1242/jcs.050443>.
- « Survival of hunger and stress: The role of rpoS in early stationary phase gene regulation in E. coli - ScienceDirect ». s. d. Consulté le 24 septembre 2019. <https://www.sciencedirect-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/science/article/pii/S09286749390655A?via%3Dihub>.
- Sutherland, Ian W. 1999. « Polysaccharases for microbial exopolysaccharides ». *Carbohydrate Polymers* 38 (4): 319- 28. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00114-3).
- Svenningsen, Mikkel Skjoldan, Alexandra Veress, Alexander Harms, Namiko Mitarai, et Szabolcs Semsey. 2019. « Birth and Resuscitation of (p)PpGpp Induced Antibiotic Tolerant Persister Cells ». *Scientific Reports* 9 (1): 1- 13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42403-7>.
- Swidsinski, Alexander, Axel Ladhoff, Annelie Pernthaler, Sonja Swidsinski, Vera Loening-Baucke, Marianne Ortner, Jutta Weber, et al. 2002. « Mucosal flora in inflammatory bowel disease ». *Gastroenterology* 122 (1): 44- 54. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.30294>.
- Swidsinski, Alexander, Jutta Weber, Vera Loening-Baucke, Laura P. Hale, et Herbert Lochs. 2005. « Spatial Organization and Composition of the Mucosal Flora in Patients with Inflammatory Bowel Disease ». *Journal of Clinical Microbiology* 43 (7): 3380- 89. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3380-3389.2005>.
- Tamano, Koichi, Shin-Ichi Aizawa, Eisaku Katayama, Takashi Nonaka, Shinobu Imajoh-Ohmi, Asaomi Kuwae, Shinya Nagai, et Chihiro Sasakawa. 2000. « Supramolecular structure of the Shigella type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors ». *The EMBO Journal* 19 (15): 3876- 87. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.15.3876>.
- Tamman, Hedvig, Andres Ainelo, Kadi Ainsaar, et Rita Hörak. 2014. « A Moderate Toxin, GraT, Modulates Growth Rate and Stress Tolerance of *Pseudomonas Putida* ». *Journal of Bacteriology* 196 (1): 157- 69. <https://doi.org/10.1128/JB.00851-13>.

- Tauber, Alfred I. 2003. « Metchnikoff and the Phagocytosis Theory ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (11): 897- 901. <https://doi.org/10.1038/nrm1244>.
- Tawfik, Ahmed, Paul K. Flanagan, et Barry J. Campbell. 2014. « Escherichia Coli-Host Macrophage Interactions in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease ». *World Journal of Gastroenterology* 20 (27): 8751- 63. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i27.8751>.
- Taylor, Jonathan D., et Steve J. Matthews. 2015. « New Insight into the Molecular Control of Bacterial Functional Amyloids ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00033>.
- Tebo, Alison G., et Arnaud Gautier. 2019. « A Split Fluorescent Reporter with Rapid and Reversible Complementation ». *Nature Communications* 10 (1): 2822. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10855-0>.
- Thomas, Wendy E., Elena Trintchina, Manu Forero, Viola Vogel, et Evgeni V. Sokurenko. 2002. « Bacterial Adhesion to Target Cells Enhanced by Shear Force ». *Cell* 109 (7): 913- 23. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00796-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00796-1).
- Tolker-Nielsen, Tim. 2015. « Biofilm Development ». *Microbiology Spectrum* 3 (2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014>.
- Torti, Frank M., et Suzy V. Torti. 2002. « Regulation of Ferritin Genes and Protein ». *Blood* 99 (10): 3505- 16. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3505>.
- Toyofuku, Masanori, Tomohiro Inaba, Tatsunori Kiyokawa, Nozomu Obana, Yutaka Yawata, et Nobuhiko Nomura. 2016. « Environmental Factors That Shape Biofilm Formation ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80 (1): 7- 12. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1058701>.
- Troxell, Bryan, et Hosni M. Hassan. 2013. « Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00059>.
- Tysk, C., E. Lindberg, G. Järnerot, et B. Flodérus-Myrhed. 1988. « Ulcerative Colitis and Crohn's Disease in an Unselected Population of Monozygotic and Dizygotic Twins. A Study of Heritability and the Influence of Smoking. ». *Gut* 29 (7): 990- 96. <https://doi.org/10.1136/gut.29.7.990>.
- Urbanowski, M. L., L. T. Stauffer, et G. V. Stauffer. 2000. « The GcvB Gene Encodes a Small Untranslated RNA Involved in Expression of the Dipeptide and Oligopeptide Transport Systems in Escherichia Coli ». *Molecular Microbiology* 37 (4): 856- 68. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02051.x>.
- Uribe-Querol, Eileen, et Carlos Rosales. 2017. « Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens ». *Frontiers in Immunology* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01368>.
- Valdebenito, Marianne, Alvin L. Crumbliss, Günther Winkelmann, et Klaus Hantke. 2006. « Environmental Factors Influence the Production of Enterobactin, Salmochelin, Aerobactin, and Yersiniabactin in Escherichia Coli Strain Nissle 1917 ». *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 296 (8): 513- 20. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.06.003>.
- Valentini, Martina, et Alain Filloux. 2016. « Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from Pseudomonas aeruginosa and Other Bacteria ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (24): 12547- 55. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.711507>.
- Valle, Jaione, Marta Vergara-Irigaray, Nekane Merino, José R. Penadés, et Iñigo Lasa. 2007. « σ B Regulates IS256-Mediated Staphylococcus aureus Biofilm Phenotypic Variation ». *Journal of Bacteriology* 189 (7): 2886- 96. <https://doi.org/10.1128/JB.01767-06>.
- Van den Bergh, Bram, Joran E. Michiels, Tom Wenseleers, Ethel M. Windels, Pieterjan Vanden Boer, Donaat Kestemont, Luc De Meester, et al. 2016. « Frequency of Antibiotic Application Drives Rapid Evolutionary Adaptation of Escherichia Coli Persistence ». *Nature Microbiology* 1 (mars): 16020. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.20>.
- VAN GENNIP, MARIA, LOUISE DAHL CHRISTENSEN, MORTEN ALHEDE, RICHARD PHIPPS, PETER ØSTRUP JENSEN, LARS CHRISTOPHERSEN, SÜNJE JOHANNA PAMP, et al. 2009. « Inactivation of the rhlA gene in Pseudomonas aeruginosa prevents rhamnolipid production, disabling the

- protection against polymorphonuclear leukocytes ». *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 117 (7): 537- 46.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02466.x>.
- Vázquez-Laslop, Nora, Hyunwoo Lee, et Alexander A. Neyfakh. 2006. « Increased Persistence in Escherichia Coli Caused by Controlled Expression of Toxins or Other Unrelated Proteins ». *Journal of Bacteriology* 188 (10): 3494- 97. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3494-3497.2006>.
- Vega, Nicole M., Kyle R. Allison, Ahmad S. Khalil, et James J. Collins. 2012. « Signaling-Mediated Bacterial Persister Formation ». *Nature chemical biology* 8 (5): 431- 33.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.915>.
- Verstraeten, Natalie, Wouter Joris Knapen, Cyrielle Ines Kint, Veerle Liebens, Bram Van den Bergh, Liselot Dewachter, Joran Elie Michiels, et al. 2015. « Opg and Membrane Depolarization Are Part of a Microbial Bet-Hedging Strategy that Leads to Antibiotic Tolerance ». *Molecular Cell* 59 (1): 9- 21. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.011>.
- Vidal, O., R. Longin, C. Prigent-Combaret, C. Dorel, M. Hooreman, et P. Lejeune. 1998. « Isolation of an Escherichia Coli K-12 Mutant Strain Able to Form Biofilms on Inert Surfaces: Involvement of a New OmpR Allele That Increases Curli Expression ». *Journal of Bacteriology* 180 (9): 2442- 49.
- Viducic, Darija, Tsuneko Ono, Keiji Murakami, Heni Susilowati, Shizuo Kayama, Katsuhiko Hirota, et Yoichiro Miyake. 2006. « Functional Analysis of SpoT, RelA and DksA Genes on Quinolone Tolerance in Pseudomonas Aeruginosa under Nongrowing Condition ». *Microbiology and Immunology* 50 (4): 349- 57. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2006.tb03793.x>.
- Vogel, Jörg, Liron Argaman, E. Gerhart H. Wagner, et Shoshy Altuvia. 2004. « The Small RNA IstR Inhibits Synthesis of an SOS-Induced Toxic Peptide ». *Current Biology* 14 (24): 2271- 76.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.12.003>.
- Vorwerk, Stephanie, Viktoria Krieger, Jörg Deiwick, Michael Hensel, et Nicole Hansmeier. 2015. « Proteomes of Host Cell Membranes Modified by Intracellular Activities of Salmonella enterica ». *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 14 (1): 81- 92.
<https://doi.org/10.1074/mcp.M114.041145>.
- Vuong, Cuong, Jovanka M. Voyich, Elizabeth R. Fischer, Kevin R. Braughton, Adeline R. Whitney, Frank R. DeLeo, et Michael Otto. 2004. « Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA) Protects Staphylococcus Epidermidis against Major Components of the Human Innate Immune System ». *Cellular Microbiology* 6 (3): 269- 75.
- Walker, Travis S., Kerry L. Tomlin, G. Scott Worthen, Katie R. Poch, Jonathan G. Lieber, Milene T. Saavedra, Michael B. Fessler, Kenneth C. Malcolm, Michael L. Vasil, et Jerry A. Nick. 2005. « Enhanced Pseudomonas aeruginosa Biofilm Development Mediated by Human Neutrophils ». *Infection and Immunity* 73 (6): 3693- 3701.
<https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3693-3701.2005>.
- Walters, Marshall C., Frank Roe, Amandine Bugnicourt, Michael J. Franklin, et Philip S. Stewart. 2003. « Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of Pseudomonas Aeruginosa Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (1): 317- 23.
<https://doi.org/10.1128/aac.47.1.317-323.2003>.
- Wandersman, Cécile, et Philippe Delepelaire. 2004. « Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores ». *Annual Review of Microbiology* 58 (1): 611- 47.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123811>.
- Wang, Tietao, Meiru Si, Yunhong Song, Wenhan Zhu, Fen Gao, Yao Wang, Lei Zhang, et al. 2015. « Type VI Secretion System Transports Zn²⁺ to Combat Multiple Stresses and Host Immunity ». *PLOS Pathogens* 11 (7): e1005020.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005020>.

- Wang, Xin, James F. Preston, et Tony Romeo. 2004. « The PgaABCD Locus of Escherichia Coli Promotes the Synthesis of a Polysaccharide Adhesin Required for Biofilm Formation ». *Journal of Bacteriology* 186 (9): 2724- 34. <https://doi.org/10.1128/jb.186.9.2724-2734.2004>.
- Watarai, M., T. Tobe, M. Yoshikawa, et C. Sasakawa. 1995. « Disulfide Oxidoreductase Activity of Shigella Flexneri Is Required for Release of Ipa Proteins and Invasion of Epithelial Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (11): 4927- 31. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.11.4927>.
- Waterman, Scott R., et David W. Holden. 2003. « Functions and Effectors of the Salmonella Pathogenicity Island 2 Type III Secretion System ». *Cellular Microbiology* 5 (8): 501- 11.
- Watnick, P. I., et R. Kolter. 1999. « Steps in the Development of a Vibrio Cholerae El Tor Biofilm ». *Molecular Microbiology* 34 (3): 586- 95. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01624.x>.
- Webb, J. L., M. W. Harvey, D. W. Holden, et T. J. Evans. 2001. « Macrophage Nitric Oxide Synthase Associates with Cortical Actin but Is Not Recruited to Phagosomes ». *Infection and Immunity* 69 (10): 6391- 6400. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6391-6400.2001>.
- Weber, Barbara, Medisa Hasic, Chang Chen, Sun Nyunt Wai, et Debra L. Milton. 2009. « Type VI secretion modulates quorum sensing and stress response in Vibrio anguillarum ». *Environmental Microbiology* 11 (12): 3018- 28. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02005.x>.
- Weber, Harald, Tino Polen, Johanna Heuveling, Volker F. Wendisch, et Regine Hengge. 2005. « Genome-Wide Analysis of the General Stress Response Network in Escherichia coli: σ S-Dependent Genes, Promoters, and Sigma Factor Selectivity ». *Journal of Bacteriology* 187 (5): 1591- 1603. <https://doi.org/10.1128/JB.187.5.1591-1603.2005>.
- Weber, Mary M., et Robert Faris. 2018. « Subversion of the Endocytic and Secretory Pathways by Bacterial Effector Proteins ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6 (janvier). <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00001>.
- Wehkamp, Jan, Martin Götz, Klaus Herrlinger, Wolfgang Steurer, et Eduard F Stange. 2016. « Inflammatory Bowel Disease ». *Deutsches Ärzteblatt International* 113 (5): 72- 82. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0072>.
- Wehkamp, Jan, Nita H. Salzman, Edith Porter, Sabine Nuding, Michael Weichenthal, Robert E. Petras, Bo Shen, et al. 2005. « Reduced Paneth cell α -defensins in ileal Crohn's disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (50): 18129- 34. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505256102>.
- Wencewicz, Timothy A., Timothy E. Long, Ute Möllmann, et Marvin J. Miller. 2013. « Trihydroxamate Siderophore-Fluoroquinolone Conjugates are Selective Sideromycin Antibiotics that Target Staphylococcus aureus ». *Bioconjugate chemistry* 24 (3): 473- 86. <https://doi.org/10.1021/bc300610f>.
- White, Carine, Jaekwon Lee, Taiho Kambe, Kevin Fritsche, et Michael J. Petris. 2009a. « A Role for the ATP7A Copper-Transporting ATPase in Macrophage Bactericidal Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (49): 33949- 56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.070201>.
- . 2009b. « A Role for the ATP7A Copper-transporting ATPase in Macrophage Bactericidal Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (49): 33949- 56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.070201>.
- Whiteley, Marvin, M. Gita Banger, Roger E. Bumgarner, Matthew R. Parsek, Gail M. Teitzel, Stephen Lory, et E. P. Greenberg. 2001. « Gene Expression in Pseudomonas Aeruginosa Biofilms ». *Nature* 413 (6858): 860- 64. <https://doi.org/10.1038/35101627>.
- Wilson, Briana R., Alexander R. Bogdan, Masaki Miyazawa, Kazunori Hashimoto, et Yoshiaki Tsuji. 2016. « Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential ». *Trends in molecular medicine* 22 (12): 1077- 90. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.10.005>.
- Wine, Eytan, Juan C Ossa, Scott D Gray-Owen, et Philip M Sherman. 2009. « Adherent-invasive Escherichia coli, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia ». *BMC Microbiology* 9 (août): 180. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-180>.

- Wong, Alexander R. C., Jaclyn S. Pearson, Michael D. Bright, Diana Munera, Keith S. Robinson, Sau Fung Lee, Gad Frankel, et Elizabeth L. Hartland. 2011. « Enteropathogenic and Enterohaemorrhagic Escherichia Coli: Even More Subversive Elements ». *Molecular Microbiology* 80 (6): 1420- 38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07661.x>.
- Wu, X. R., T. T. Sun, et J. J. Medina. 1996. « In Vitro Binding of Type 1-Fimbriated Escherichia Coli to Uroplakins Ia and Ib: Relation to Urinary Tract Infections ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (18): 9630- 35. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9630>.
- Yang, Jinming, et Ann J. Richmond. 2009. « MONITORING NF- κ B MEDIATED CHEMOKINE TRANSCRIPTION IN TUMORIGENESIS ». *Methods in enzymology* 460: 347- 55. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)05217-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)05217-3).
- Yu, J., H. Webb, et T. R. Hirst. 1992. « A Homologue of the Escherichia Coli DsbA Protein Involved in Disulphide Bond Formation Is Required for Enterotoxin Biogenesis in Vibrio Cholerae ». *Molecular Microbiology* 6 (14): 1949- 58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01368.x>.
- Yu, Linda Chia-Hui. 2018. « Microbiota dysbiosis and barrier dysfunction in inflammatory bowel disease and colorectal cancers: exploring a common ground hypothesis ». *Journal of Biomedical Science* 25 (novembre). <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0483-8>.
- Yu, Shan, Qing Wei, Tianhu Zhao, Yuan Guo, et Luyan Z. Ma. 2016. « A Survival Strategy for Pseudomonas Aeruginosa That Uses Exopolysaccharides To Sequester and Store Iron To Stimulate Psl-Dependent Biofilm Formation ». *Applied and Environmental Microbiology* 82 (21): 6403- 13. <https://doi.org/10.1128/AEM.01307-16>.
- Zogaj, X., M. Nimtz, M. Rohde, W. Bokranz, et U. Römling. 2001. « The Multicellular Morphotypes of Salmonella Typhimurium and Escherichia Coli Produce Cellulose as the Second Component of the Extracellular Matrix ». *Molecular Microbiology* 39 (6): 1452- 63. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02337.x>.
- Zouiten-Mekki, Lilia, Meriem Serghini, Monia Fekih, Lamia Kallel, Samira Matri, Nadia Ben Mustapha, Jalel Boubaker, et Azza Filali. 2013. « Rôle de la cellule épithéliale dans l'homéostasie intestinale et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ». *médecine/sciences* 29 (12): 1145- 50. <https://doi.org/10.1051/medsci/20132912019>.