



**HAL**  
open science

**Identification des facteurs favorisant l'implantation des  
Escherichia coli adhérents et invasifs chez les patients  
atteints de maladie de Crohn : rôle de régulateurs  
épigénétiques et du régime alimentaire de type  
occidental**

Mélissa Chervy

► **To cite this version:**

Mélissa Chervy. Identification des facteurs favorisant l'implantation des Escherichia coli adhérents et invasifs chez les patients atteints de maladie de Crohn : rôle de régulateurs épigénétiques et du régime alimentaire de type occidental. Médecine humaine et pathologie. Université Clermont Auvergne, 2022. Français. NNT : 2022UCFAC071 . tel-04091813

**HAL Id: tel-04091813**

**<https://theses.hal.science/tel-04091813>**

Submitted on 9 May 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ, AGRONOMIE  
ET ENVIRONNEMENT

*Thèse*

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

Spécialité : Biologie Santé  
*Soutenue le 16 décembre 2022 par*

**Mélissa CHERVY**

**Identification des facteurs favorisant l'implantation  
des *Escherichia coli* adhérents et invasifs chez les  
patients atteints de maladie de Crohn :  
rôle de régulateurs épigénétiques et du régime  
alimentaire de type occidental**

Rapporteurs :

**Dr. Laurence ARBIBE**, Directrice de Recherche, Institut Necker Enfants Malades, INSERM UMR S1151, Université Paris Descartes, Paris

**Pr. Sophie THENET**, Directrice d'Études à l'EPHE, Centre de Recherche Saint-Antoine, INSERM UMRS 938, Sorbonne Université, Paris

Examineurs :

**Pr. Emilie BRASSET**, Professeure des Universités, iGred, INSERM U1103, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand

**Dr. Benoit CHASSAING**, Directeur de Recherche, Institut Cochin, INSERM U1016, Université Paris Cité, Paris

**Pr. Jean-Pierre HUGOT**, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Centre de Recherche sur l'Inflammation, INSERM U1149, Université Paris Diderot-Sorbonne Paris-Cité, Paris

Directeur de thèse :

**Dr. Jérémy DENIZOT**, Maître de Conférences des Universités, M2iSH, INSERM U1071, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand

Membre invité :

**Pr. Nicolas BARNICH**, Professeur des Universités, M2iSH, INSERM U1071, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand

Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte - M2iSH  
Université Clermont Auvergne, UMR 1071 INSERM, INRAe USC-2018, Clermont-Ferrand

## Remerciements

---

*Je tiens très sincèrement à remercier Madame la Docteure **Laurence Arbibe** et Madame la Professeure **Sophie Thenet** d'avoir accepté d'être les rapportrices de ce travail de thèse. Je les remercie d'avoir consacré du temps à la lecture, à l'analyse et à la critique de ce manuscrit.*

*Je souhaiterais également remercier Madame la Professeure **Emilie Brasset**, qui a suivi l'évolution de mes travaux au cours des différents comités de thèse, Monsieur le Docteur **Benoit Chassaing**, avec qui j'ai eu la chance de travailler durant mon Master 1, ainsi que Monsieur le Professeur **Jean-Pierre Hugot**, d'avoir accepté de participer à ce jury et d'examiner ce travail.*

***Benoit**, encore merci de m'avoir accueillie dans ton laboratoire à Atlanta (même si notre rencontre a été retardée de 2 semaines à cause d'une petite histoire de vol à Paris...). J'ai beaucoup aimé réaliser ce stage sous ton encadrement. C'était vraiment une belle expérience, très enrichissante professionnellement et humainement. Merci également pour tous les à-côtés durant cette période, où avec Emilie et Martin (et Alexis !), vous vous êtes très bien occupés de moi en me faisant découvrir la ville et ses environs.*

*Je remercie aussi très chaleureusement Monsieur le Professeur **Nicolas Barnich**, pour m'avoir accueillie dans le laboratoire dès mon stage de DUT et pour avoir gardé contact par la suite pour que je revienne en M2. Merci **Nico** d'avoir toujours été présent et disponible au cours de ma thèse, jusqu'à cette soutenance en tant que membre invité. Je serais toujours impressionnée par la quantité de travail que tu as et comment tu arrives à la gérer. Tu ne t'arrêtes jamais, tu travailles même en rentrant de soirée pendant les congrès ! Mais malgré tout, tu as toujours trouvé du temps pour suivre le projet et me conseiller. Encore merci pour les corrections et les suggestions concernant la rédaction de l'article et de ce manuscrit.*

*Je n'oublie évidemment pas de remercier le dernier membre de ce jury de thèse mais surtout mon chef, Monsieur le Docteur **Jérémy Denizot** ou plutôt **Jérem**. Je suis très contente d'avoir été ta première étudiante (officielle). Je ne pensais pas que le prof de l'IUT qui noterait mon PTUT sur la chronobiologie serait un jour mon directeur de thèse ! Merci de m'avoir accompagnée et supportée durant toutes ces années de travail ensemble (et encore plus pendant la rédaction, sorry...). Je sais que je n'aurais pas aussi bien « matché » avec un autre chef du labo. Tu es et as toujours été disponible, à l'écoute et présent. Sans toi, il n'y aurait rien, vraiment. J'ai toujours été admirative de ta passion et de la rapidité à laquelle tu pouvais avoir des idées. Toi non plus, tu ne t'arrêtes jamais, ton cerveau est toujours en marche. J'espère un jour arriver à ton niveau. Les discussions professionnelles (ou non) sur la passerelle vont me manquer, tout comme les moments en dehors du labo. Merci également de m'avoir offert l'opportunité de partir en congrès que ce soit à Saint-Malo ou à San Diego. C'étaient vraiment de belles expériences et je n'en garde que de bons souvenirs. Il y a juste une chose pour laquelle je ne te remercie pas : les photos de moi en train d'essayer un ciré !*

***Adeline**, ma colocataire de chambre à San Diego. On aura bien ri et mangé (et travaillé évidemment) durant cette semaine américaine. Je connais désormais tous tes secrets beauté ! Merci pour ton aide et ton expertise durant ces dernières années, notamment pour les manip in vivo pour lesquelles je t'ai sollicité de très nombreuses fois (au moment où j'écris, on est en pleine manip Villin, merci pour le pansement suite à la morsure du triple connard). Tout va beaucoup plus vite quand tu es là. J'ai beaucoup aimé travailler avec toi sur le modèle Villin, je me retrouvais*

bien dans ton organisation et ta rigueur. Je suis contente que le papier ait été accepté pendant que j'étais encore présente. Merci aussi de toujours trouver du temps pour répondre à mes questions ou demandes malgré toutes les sollicitations auxquelles tu dois faire face chaque jour. Je te remercie également pour ton dynamisme, ta bonne humeur et ta bienveillance, même si tu m'as incitée à prendre de la drogue !

Mon mari, **Fred**. Tu n'es pas arrivé depuis longtemps mais c'est comme si tu avais toujours été là. Tu as rapidement fait l'unanimité, comme en témoigne ton harem. Merci pour ta bonne humeur constante, ton rire communicatif, ta culture musicale, et toutes tes blagues et conneries (qui va répondre aux démarcheurs à ma place maintenant... ?). Je me suis habituée à te voir débarquer dans le bureau, prendre une chaise et discuter. Merci pour ta présence durant les moments de rédaction quelque peu compliqués (je ne remercie pas les hormones pour le coup) et les petits restos chez Alfred. J'espère que tes projets vont rapidement démarrer ! N'oublie pas d'écrire un mot sur ma carte et de divorcer d'avec moi avant de me remplacer par une nouvelle petite jeune ! Bisous à Newton !

**Mathilde, Delphine, Elisabeth**, je vous remercie pour votre gentillesse et votre bienveillance constantes. J'ai été ravie d'apprendre à vous connaître au cours de ces années même si j'avoue que j'ai eu un peu de mal à vous tutoyer sachant que vous étiez mes profs à l'IUT. Merci **Mathilde** de régulièrement passer une tête dans le bureau pour discuter et prendre de mes nouvelles. On sait qu'on stressera ensemble les prochaines semaines pour nos oraux respectifs ! Merci **Delphine** pour les TP à l'IUT, j'ai apprécié passer de l'autre côté et faire les TP de mycologie avec toi ! **Elisabeth**, je te remercie pour ta gentillesse et de m'avoir supporté quand je venais dans ton bureau pour travailler avec Jérémy, j'espère n'avoir pas fait trop de bruit !

Pour terminer avec la team IUT, je tenais à te remercier **Lucie**, ou plutôt « Professeure ». J'ai beaucoup aimé faire les TP avec toi en parallèle. Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité quand j'avais des questions ou des doutes. Tu as toujours été bienveillante et à l'écoute. Je te remercie également pour ton soutien, tes conseils quant à l'avenir et tous les moments de détente à l'IUT ou en dehors ! Merci Bob !  
Merci aussi à Catherine et maintenant Laurène pour la préparation parfaite des TP.

**Gwen, Alex et Vivi**, la petite famille du midi. Merci pour votre bonne humeur, votre humour et toutes les discussions sérieuses ou improbables qui rendent ce temps de pause très convivial. **Gwenita**, toujours à courir partout, j'espère que tu finiras par avoir un poste au laboratoire, tu le mérites tellement. Ta gentillesse et tes ouvertures de porte fracassantes vont me manquer. Je te souhaite tout le meilleur avec Guillaume, Gabin et bébé n°2. Merci **Alex** pour tout ce que tu fais pour le commun au laboratoire. Tu m'as souvent fait gagner du temps ! Je te souhaite plein de bonheur avec Alice et tous tes animaux. Ma petite **Vivi**, toi aussi tu es sur tous les fronts. Merci pour ta disponibilité et ton soutien malgré tout ton boulot. Et merci de toujours essayer d'améliorer l'organisation des labos/animalerie et de gérer le Secret Santa chaque année ! Fais un bisou à Zozo et Clément pour moi.

Merci aussi à **Valérie, Hang et Guillaume** pour votre gentillesse et bienveillance (et Guillaume pour ton humour aussi évidemment !). **Valérie**, n'oublie pas que les portes du labo ne se ferment qu'à 19h, tu peux sortir sans badge avant cette heure-ci sans avoir peur d'être enfermée ! Merci **Caro** pour ta gentillesse et pour m'avoir permis d'avoir un deuxième écran pendant la rédaction, c'était beaucoup mieux ! **Pedro**, merci pour ton aide avec les échantillons de patients. Grâce à toi, nous avons pu avoir des belles coupes malgré l'état des blocs ! Merci **Lucas et Michaël**, pour vos blagues et votre bonne humeur. Je peux toujours compter sur vous pour venir m'embêter gentiment ! **Lucas**, merci pour ta compagnie dans le labo (ou à l'animalerie quand il n'y a plus de ventilation),



*j'espère que désormais, avec toutes les nouvelles, tu seras moins seul. J'espère aussi que tu prendras un malin plaisir à faire peur à quelqu'un d'autre maintenant ! **Micha**, chef biomol, merci pour ton expertise. Je suis contente que mon cousin portugais soit revenu à 100% au labo. **Pat**, merci pour tout ton travail qui facilite le nôtre au quotidien. Je te remercie de toujours faire ton possible pour nous arranger et répondre à nos demandes le plus rapidement possible. **Sandra**, merci pour ton aide précieuse avec les animaux. Grâce à toi je sais qu'ils sont entre de bonnes mains. **Magalie**, merci pour ta réactivité et ton efficacité (même quand tu es en arrêt maladie !). J'espère que tu seras rapidement remise sur pieds. Merci **Laurent**, grâce à toi, il ne manque jamais de rien pour les pauses café ou le midi. Merci **Aurélien** pour les raclettes party et tous les produits que tu nous fais découvrir. **Devon**, merci pour ta gentillesse et ta disponibilité pour corriger nos documents en anglais. J'espère que tu trouveras un poste qui te permettra à ta famille et toi de rester dans la région.*

*Merci aussi à mes copines thésardes **Amandine**, **Hélène**, **Alison**, **Héloïse** et **Margot** pour votre bonne humeur et votre gentillesse. Je vous souhaite le meilleur pour la suite de votre thèse mais je sais que vous êtes de grosses bosseuses ! Tout se passera bien ! Ne perdez pas votre motivation s'il y a des moments où vous êtes dans le dur, on a tous eu des périodes de creux. La thèse ne serait pas drôle sinon ! **Amandine**, merci pour ta bonne humeur constante et ton humour. Je sais que quand tu viens t'asseoir dans le bureau, les anecdotes valent toujours le coup. Merci aussi pour nos goûters chez « Kookies » ou nos sorties pour aller manger des tapas. Merci **Hélène** (j'ai encore mis le H, désolée...) pour ta gentillesse, ton calme et nos discussions. Je n'oublie pas que si une certaine personne te propose d'aller boire un verre, je t'accompagne ! Et inversement ! Merci **Alison**, ma voisine de pailleasse, pour ton humour, pour Nostalgie à fond dans le labo et tes petits râlements que j'adore ! J'espère que d'ici la fin de ta thèse, tu arriveras à reprendre à Fred le contrôle de la radio dans le labo. Et mets peut-être un casque pour la prochaine journée de l'unité ! **Héloïse**, merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ta ponctualité (pardon, je n'ai pas pu m'en empêcher). Ton rythme de vie m'impressionnera toujours. Tu as toujours mille choses prévues ! Merci aussi **Margot** pour ta gentillesse et bienveillance. Un jour, tu me diras ce que tu ne sais pas faire étant donné que tu sais danser, dessiner, coiffer ou masser.*

*Vous allez me manquer !*

*Je remercie aussi les nouvelles thésardes **Flavie**, **Coline**, **Fanny**, **Leslie** (j'en profite pour aussi remercier **Elisa** qui vient de partir) pour votre bonne humeur et votre énergie toute neuve ! Je vous souhaite de vous épanouir dans cette nouvelle aventure qu'est la thèse. Je vous ai quelque peu abandonné du bureau ces derniers temps mais je sais que vous êtes entre de bonnes mains avec Gwen ! **Flavie**, merci pour ton aide pour les manip sur les derniers mois ! J'espère que ta première expérience in vivo ne t'a pas trop traumatisée ! Je suis contente d'avoir pu travailler avec toi (et pour quelques petits mois encore). Maintenant c'est toi qui prends la suite du projet. Je ne me fais pas de souci, je sais que tu vas réussir cette thèse sans problème. Tu as un très bon chef pour t'encadrer, vous allez faire une super équipe avec Jérem ! Je te souhaite le meilleur (et relax hein !). Aussi merci **Coline** pour ton dynamisme et ton sens de la conversation sans pareil et **Fanny** pour ta gentillesse et bienveillance. Et toi aussi, relax ! Tout va très bien se passer. Si besoin, ta cheffe pourra te donner du CBD !*

***Angeline**, **Chloé**. On ne s'est pas beaucoup côtoyé pour le moment mais je vous remercie pour votre gentillesse et votre bonne humeur. Je ne suis pas inquiète pour vous, je sais que vous êtes déjà très bien intégrées. Je sens aussi que le binôme Amandine-Chloé va valoir des points !*

*Merci aussi aux anciens du M2iSH !*

*Ma petite **Clarus**. J'ai l'impression que ça ne fait pas si longtemps que je lisais tes remerciements et maintenant c'est à moi de te remercier. Merci pour ton calme, ta sagesse, nos fous rires, toutes les discussions sur la vie qu'on a pu avoir le soir. Je me souviendrais toujours quand tu m'as annoncée que tu étais enceinte ! Je te remercie de m'avoir fait confiance pour me confier ce secret ! Merci aussi pour tous les moments en dehors du labo, souvent dans des bars, notamment à la bamboche qui est devenu notre QG avec **Claire** à la fin ! Je te souhaite tout le meilleur pour ta nouvelle vie parisienne et pour la suite avec JP et Poupinette (Poupi poupi poupinette) ! Je viendrai vous voir à Paris !*

***Claire**, notre Bretonne/Canadienne. Merci pour ta gentillesse, tes conseils et ton soutien durant le temps où tu étais là et même après. Merci aussi pour toutes nos discussions et pour ton aide pour les vidéos de thèse, on aura découvert pleins de bruitages ! Je te remercie aussi pour toutes nos sorties dans les bars durant lesquelles on aura bien ri (#cœursurlafenêtre). Je te souhaite de t'épanouir pleinement au niveau professionnel et personnel au Canada, tu le mérites. Ça me manque de ne plus entendre parler de Fougères et de ne plus t'entendre râler au bureau. Le duo que tu formais avec **Laurène** était iconique. Bizarrement, depuis que vous êtes parties, j'entends beaucoup moins parler de l'Institut Pasteur, je ne comprends pas... **Laurène**, ou plutôt la Duchesse. Toi aussi, je te remercie pour tes conseils et ton soutien. Merci pour toutes tes pépites (Dieu sait qu'il y en a eu), ton rire si discret et ta soif inépuisable de potins. Je sais que tu es en manque maintenant que tu es à Paris ! Merci aussi de m'avoir demandé d'être ta demoiselle d'honneur, ce fut un réel plaisir ! Et ton mariage était magnifique, je m'en souviendrai (et du brunch plein de surprises aussi) ! Je te souhaite plein de bonheur dans ton boulot et avec ton mari à Paris. J'espère que vous allez rapidement fonder la famille que tu désires tant.*

***Rominou**, Monsieur le MCU. On n'a pas trouvé plus gentil que toi depuis ton départ, après je ne suis pas sûre que ça existe. Tu manques à tout le monde (par contre, on est un peu content que tu ne joues plus le rôle de patient 0 et que tu contamines tout le monde au labo !). Merci pour ta gentillesse incomparable, tes discours rassurants (on fait partie de la même team « stressé ») et tous les moments qu'on a passé ensemble en dehors du labo, durant lesquels on aura bien ri ! Promis, je viendrai vous voir Aurélie et toi à Poitiers, depuis le temps qu'on en parle !*

*Merci **Tommy** d'avoir été mon parrain de thèse. Merci aussi pour tes conseils quant à la gestion de la fin de thèse et à l'avenir ;) Je te souhaite le meilleur pour ta nouvelle aventure parisienne, j'espère que tu t'épanouiras dans ton nouveau poste.*

***Élia**, merci pour ta gentillesse, ton aide et tes expressions un peu beaux ! Tu nous as quittés mais seulement pour aller dans le bâtiment d'en face. Ça nous arrange bien avec les filles, comme ça on peut te voir régulièrement ! Je te souhaite tout le meilleur au Gred avec tes petites mouches.*

***Maëva**, j'en aurais des choses à dire... Je vais essayer de ne pas être trop longue ! On a très vite « matché » toutes les 2. Après, qui ne matche pas avec Maëva Meynier aussi ! Je me souviens de notre première discussion en culture cell quand les résultats du M2 sont tombés et que tu avais décidé qu'on serait copines ! Merci pour ton soutien sans faille depuis le Master, de toujours être là quand j'en ai besoin (#cetété), merci pour tes conneries, ta bonne humeur, ton répertoire musical très varié... Merci pour les pauses imposées, pour les fous rires, nos discussions sur*

*l'avenir et tes conseils (très) avisés (mon choix s'est porté sur le sport au final hein !). Je te remercie de porter le même amour que moi pour la bouffe. On en aura mangé des McDo, des sushis et des gâteaux ! Ne jamais nous inviter à un pot de thèse... Je te souhaite tout le meilleur à Nice et pour tout ce qui suivra après. Neurodol et le M2iSH ne sont pas près de retrouver une thésarde de ton calibre, il n'y a pas meilleure que toi (et je ne dis pas ça parce que tu es ma copine). Rien ne te fait peur ou ne t'arrête, et je t'admire pour ça. Les « ça suffit Mélissa ! » ou « Chaudière ! » me manquent déjà <3. J'espère seulement que tu ne te feras pas attaquer par les sangliers qui vivent à proximité de ton labo, sachant que tu ne fais déjà pas la fière devant un hérisson !*

*Merci à mes amis et à ma famille.*

***J-B...** Lala, par où commencer. Déjà, je ne te remercie pas de m'avoir lâchement abandonné pour aller faire ta thèse à Dijon avec une ancienne du M2iSH ! Mais bon, même si on n'était pas dans les mêmes villes, tu as toujours été là pour moi. Une disponibilité comme je n'ai jamais connu et merci, vraiment. Je sais que tu répondras direct si j'ai besoin. J'ai toujours eu plus de nouvelles de toi que de certaines autres personnes sur Clermont. Merci pour toutes ces soirées au téléphone à regarder KL, des films nuls, parler de nos tocs communs, débriefer de nos journées de boulot, parler de tout, de rien (#sitesdechat) ... J'espère que pour notre prochain travail, on sera dans la même ville, ou beaucoup plus proche ! Grâce à toi, j'ai aussi découvert de nombreuses expressions comme « purée de pois de chien », « peuchère » ou « mon cul sur la commode » qui est ma préférée. Par contre, je ne sais pas s'il faut que je te remercie pour toutes les insultes en arabe et en albanais que tu m'as apprise. Merci pour tous les week-ends qu'on a passés ensemble quand tu venais à Clermont ou quand je venais sur Dijon (ok, seulement 2 fois). Merci mon complice (que tous les curieux qui liront ces remerciements se détendent, ce n'est pas mon copain, c'est une private joke !). J'espère que tu réaliseras ton rêve : aller au Chantilly ! Je vais maintenant remercier ta femme n°1, **Marine**. Madame, merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur constante. On retourne à Dijon ensemble quand vous voulez ! J'ai déjà envie de remanger à Monsieur Moutarde ou au Bouillon. Plus sérieusement, tu es une des meilleures thésardes que je connaisse, je ne me fais pas de souci pour ta future carrière ! Et si tu veux arrêter la science, tu pourras toujours proposer tes services pour faire des albums de thèse, celui de la mère Calvary va être magnifique ! Je te remercie également de m'avoir permis de reprendre la gym avec **Lisa** et toi. Hâte de vous revoir performer au gala ! Merci aussi à vous deux pour toutes les petites sorties à la bamboche ou au Mokoo/petit robot.*

*Merci aussi **Hugo** pour ton soutien et tes conseils durant cette thèse. Je te souhaite le meilleur pour l'après thèse, j'espère que tu t'épanouiras dans ton prochain poste. Merci aussi **Thomas** pour nos discussions en fin de thèse, on aura été quasi synchrones pour le rendu.*

***Carla et Lili**, ma dream team <3. Merci pour votre amitié sans faille depuis l'IUT (déjà !). Merci de supporter mes boulettes constantes et de m'avoir soutenue pendant cette thèse. Merci pour tous les week-ends qu'on a passés que ce soit à Lyon, Clermont, dans le Sud ou à Disney, tous les restos/repas et les fous rires qu'on a partagés ensemble. J'aurais aimé plus venir vous voir mais entre le Covid et la thèse, ça n'a pas toujours été simple. Je vous remercie de votre compréhension pour ça. Promis, une fois que le spectacle de fin d'année sera passé, j'aurais plus de temps ! Merci aussi pour toutes vos conneries, votre humour et les foutages de gueule (surtout Carlita hein, on va être réaliste !). Merci pour tout, je sais que je peux compter sur vous. On se revoit vite avec vos « Jules » respectifs ;) **PA**, merci pour ton humour et pardon pour ton tapis plein d'Ice tea. Merci **Rebibi** pour les week-ends parisiens et*

*tous les bons moments passés ensemble. Je te souhaite le meilleur pour ton nouveau poste, tu vas pouvoir te rapprocher de tes proches comme tu le souhaitais depuis plusieurs années ! On se voit vite !*

*Évidemment, je remercie ma famille pour son soutien au cours de cette thèse. Merci **Tata, Sophie, Franck, Claire et Mathis** pour tous les repas de famille et les moments partagés ensemble. Merci à mes parents qui m'ont toujours laissé libre de faire les études que je voulais. Merci **Papa** pour ton soutien et les tomates et pommes de terre du jardin, j'ai hâte d'être à l'année prochaine pour en remanger ! Merci **Maman** de toujours essayer de me rassurer et de croire en moi. Merci aussi pour les plats que tu me prépares quand je rentre sur Moulins. Mes collègues sont toujours jaloux quand ils voient le pâté aux pommes de terre que tu m'as préparé. Un IMMENSE merci à mon frère **Gwenn, Nonore** (c'est comme si tu étais ma sœur maintenant) et à mon petit poussin **Éléna** <3. Merci pour tout, votre soutien, votre accueil quand je viens à Moulins, votre aide, vos conseils et vos bêtises (surtout Lélé pour ça). Vous êtes au top ! Merci aussi **Nonore** pour le partage des recettes et **Lélé** d'être un petit rayon de soleil. Je suis fière d'être ta marraine. **Gwenn**, je te remercie de jouer ton rôle de frère à la perfection à la fois en me soutenant et à la fois en me faisant chier et te moquant de moi à la moindre occasion, un beau combo. Je sais que je peux compter sur toi pour les 2.*

*Merci à tous*

# Mélissa CHERVY

Date de naissance : 24/04/1995

Nationalité : française

Téléphone : 06 42 58 96 93

Mail : melissa.chervy@uca.fr

melissa.chervy@gmail.com

---

## FORMATION

---

### **2019-auj : Doctorat, spécialité Biologie Santé**

Laboratoire M2iSH, UMR 1071 INSERM/Université Clermont Auvergne/USC INRAE 2018, Clermont-Ferrand, FRANCE

École doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement

### **2017-2019 : Master Biologie Santé, option Génétique, Physiologie et Pathologie**

Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, FRANCE

### **2016-2017 : Licence Sciences de la Vie, parcours Biologie Cellulaire et Physiologie**

Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, FRANCE

### **2014-2016 : DUT Génie Biologique, option Analyses Biologiques et Biochimiques**

Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, FRANCE

---

## EXPÉRIENCES EN RECHERCHE

---

### **2019-auj : Doctorat, spécialité Biologie Santé**

“Identification des facteurs favorisant l’implantation des *Escherichia coli* adhérents et invasifs chez les patients atteints de maladie de Crohn : rôle de régulateurs épigénétiques et du régime alimentaire de type occidental”

Laboratoire M2iSH, UMR 1071 INSERM/Université Clermont Auvergne/USC INRAE 2018, Clermont-Ferrand, FRANCE

Financement : Fondation Recherche Médicale (FRM)

Directeur de thèse : Dr. Jérémie DENIZOT

### **Jan-Juin 2019 : Stage de Master 2 (6 mois)**

“Rôle des histones désacétylases dans le processus d’invasion des cellules épithéliales intestinales par les *Escherichia coli* adhérents et invasifs associés à la maladie de Crohn »

Laboratoire M2iSH, UMR 1071 INSERM/Université Clermont Auvergne/USC INRAE 2018, Clermont-Ferrand, France

Encadrant : Dr. Jérémie DENIZOT

### **Juin-Août 2018 : Stage de Master 1 (10 semaines)**

“Rôle du microbiote intestinal dans le lien entre stress psychologique et inflammation intestinale”  
Chassaing lab, Neuroscience Institute and Institute for Biomedical Sciences, Georgia State University, Atlanta, USA

*Encadrant* : Dr. Benoit CHASSAING

### **Avr-Juin 2016 : Stage de DUT (10 semaines)**

“Étude de la régulation de l’expression du flagelle de la souche AIEC LF82 par les conditions environnementales »

Laboratoire M2iSH, UMR 1071 INSERM/Université Clermont Auvergne/USC INRAE 2018, Clermont-Ferrand, FRANCE

*Encadrante* : Dr. Gwladys SEVRIN

## **PUBLICATIONS**

---

Chervy, M., Sivignon, A., Dambrine, F., Buisson, A., Sauvanet, P., Godfraind, C., Allez, M., Le Bourhis, L., The Remind group, Barnich, N., & Denizot, J. (2022). **Epigenetic master regulators HDAC1 and HDAC5 control pathobiont Enterobacteria colonization in ileal mucosa of Crohn’s disease patients.** *Gut Microbes* 14 (1), 2127444. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2127444>.

Sivignon, A., Chervy, M., Chevarin, C., Ragot, E., Billard, E., Denizot, J., & Barnich, N. (2022). **An adherent-invasive *Escherichia coli*-colonized mouse model to evaluate microbiota-targeting strategies in Crohn’s disease.** *Disease Models & Mechanisms* 15 (10), dmm049707. <https://doi.org/10.1242/dmm.049707>

Delaroque, C., Chervy, M., Gewirtz, A.T., & Chassaing, B. (2021). **Social overcrowding impacts gut microbiota, promoting stress, inflammation, and dysglycemia.** *Gut Microbes* 13 (1), 2000275. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2000275>.

Agus, A., Richard, D., Faïs, T., Vazeille, E., Chervy, M., Bonnin, V., Dalmasso, G., Denizot, J., Billard, E., Bonnet, R., *et al.* (2021). **Propionate catabolism by CD-associated adherent-invasive *E. coli* counteracts its anti-inflammatory effect.** *Gut Microbes* 13, 1–18. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1839318>.

Chervy, M., Barnich, N., & Denizot, J. (2020). **Adherent-Invasive *E. coli*: Update on the Lifestyle of a Troublemaker in Crohn’s Disease.** *International Journal of Molecular Sciences* 21 (10), 3734. <https://doi.org/10.3390/ijms21103734>.

Gimier, E., Chervy, M., Agus, A., Sivignon, A., Billard, E., Privat, M., Viala, S., Minet-Quinard, R., Buisson, A., Vazeille, E., Barnich, N., & Denizot, J. (2020). **Methyl-donor supplementation prevents intestinal colonization by Adherent-Invasive *E. coli* in a mouse model of Crohn’s disease.** *Scientific Reports* 10, 12922. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69472-3>.



## DIFFUSION SCIENTIFIQUE

---

### Communications orales :

**Role of HDAC in the mechanism of infection of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *Escherichia coli* bacteria isolated from patients with Crohn's disease.** M. Chervy, N. Barnich, J. Denizot. *Journées de l'École doctorale*, Mai 2021, Clermont-Ferrand, FRANCE

**Role of HDAC in the mechanism of infection of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *Escherichia coli* bacteria isolated from patients with Crohn's disease.** M. Chervy, N. Barnich, J. Denizot. *Groupe Régional de Recherche en Microbiologie des Interactions (G-RREMI)*, Janvier 2021 - Virtuel

**Identification of HDAC1-regulated gene *EMP2* as a new therapeutic target to limit AIEC colonization in CD patients.** M. Chervy, N. Barnich, J. Denizot. *United European Gastroenterology Week (UEGW)* - Octobre 2020 – Virtuel

### Communications affichées :

**Epigenetic master regulators HDAC1 and HDAC5 control pathobiont Enterobacteria colonization in ileal mucosa of Crohn's disease patients.** M. Chervy, A. Sivignon, F. Dambrine, A. Buisson, P. Sauvanet, C. Godfraind, M. Allez, L. Le Bourhis Lionel, The Remind group, N. Barnich, J. Denizot. *EMBO Workshop, Pathogen immunity and signaling*, Avril 2022, Saint-Malo, FRANCE

**Epigenetic master regulators HDAC1 and HDAC5 control pathobiont Enterobacteria colonization in ileal mucosa of Crohn's disease patients.** M. Chervy, A. Sivignon, F. Dambrine, A. Buisson, P. Sauvanet, C. Godfraind, M. Allez, L. Le Bourhis Lionel, The Remind group, N. Barnich, J. Denizot. *Digestive Disease Week*, Mai 2022, San Diego, États-Unis

### Vulgarisation scientifique :

Animation du stand "Le Laboratoire des Explorateurs du Vivant », *Nuées Ardentes*, Juin 2021, Clermont-Ferrand, FRANCE

## ENSEIGNEMENTS ET ENCADREMENTS

---

### Enseignements :

#### **2019-2022 : Enseignements en Microbiologie**

IUT de Clermont-Ferrand, DUT Génie Biologique, option Analyses Biologiques et Biochimiques, 1<sup>ère</sup> année, 64h équivalent TD annuel.

### Encadrement :

**Avr-Juin 2021 : Lukas ORTIZ**, 2<sup>ème</sup> année DUT Génie Biologique, option Analyses Biologiques et Biochimiques

«Rôle des histones désacétylases dans la colonisation intestinale par les *Escherichia coli* adhérents et invasifs isolés de patients atteints de maladie de Crohn »

**Jan 2022 (1 semaine) : Anaëlle SEULIN**

**Juin 2021 (1 semaine) : Antonio DE SOUSA**

**Déc 2019 (1 semaine) : Kévin DELVAL**

Stages de découverte

Élèves de 3<sup>ème</sup> / seconde

# Sommaire

---

Liste des figures et des tables

Abréviations

Résumé

Présentation du manuscrit..... 1

## Étude bibliographique

**Première partie : Régulation épigénétique de l'expression des gènes**..... 2

**I. Structure de l'ADN**..... 2

**II. Les différentes régulations épigénétiques connues**..... 3

1. ARNs non codants : les miARNs..... 3

2. Méthylation de l'ADN..... 4

a. Acteurs impliqués dans la méthylation de l'ADN..... 4

b. Voies de déméthylation de l'ADN..... 5

3. Modifications post-traductionnelles des histones..... 5

a. Les différentes modifications post-traductionnelles des histones..... 5

b. Acteurs impliqués dans la modification post-traductionnelle des histones..... 6

c. Conséquences des modifications post-traductionnelles des histones..... 6

d. Acétylation des histones..... 7

e. « Readers » de l'acétylation des histones..... 8

f. Désacétylation des histones..... 9

i. Les différentes classes de HDACs..... 9

ii. Les substrats des HDACs..... 9

iii. Complexes protéiques impliquant les HDACs..... 10

iv. Modifications post-traductionnelles des HDACs..... 11

**III. Rôle des HDACs en condition physiologique et pathologique**..... 12

1. Les inhibiteurs de HDACs (HDACi)..... 13

a. Les différents types de HDACi..... 13

b. Spécificité des HDACi..... 14

2. Rôles des HDACs dans les processus cancéreux..... 14

a. HDACs dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose..... 15

b. HDACs dans les mécanismes de réparation de l'ADN..... 15

c. HDACs dans le contrôle de la transition épithélio-mésenchymateuse et de l'angiogenèse.. 16

d. Utilisation des HDACi en thérapie anti-cancéreuse..... 16

3. Rôles des HDACs au niveau du système nerveux central..... 18

4. Rôles des HDACs dans le maintien de l'homéostasie intestinale..... 19

a. HDACs et physiologie intestinale..... 19

b. HDACs et fonction de barrière intestinale..... 20

c. HDACs et régulation des rythmes circadiens..... 21

5. Rôles des HDACs dans la régulation de l'inflammation..... 22

a. Rôle des HDACs dans les cellules immunitaires..... 22

b. Rôles des HDACs dans les maladies inflammatoires..... 23

i. Arthrite rhumatoïde (AR)..... 23

ii. Spondylarthrite ankylosante (SA)..... 24

c. Rôle des HDACs dans l'inflammation intestinale..... 24

<b>Deuxième partie : Modulations des marques épigénétiques</b> .....	27
<b>I. Impact de l'environnement sur les marques épigénétiques</b> .....	27
1. Régime alimentaire .....	27
a. Chez les abeilles .....	27
b. Le régime enrichi en graisses.....	28
i. Effets sur la méthylation de l'ADN .....	28
ii. Effets sur les modifications post-traductionnelles des histones .....	28
iii. Effets sur les miARNs .....	29
c. Les donneurs de groupements méthyles .....	29
d. Autres facteurs alimentaires .....	30
i. La restriction calorique .....	30
ii. Les polyphénols .....	30
iii L'alcool .....	31
2. Le tabac.....	32
a. Effets sur la méthylation de l'ADN .....	32
b. Effets sur les modifications post-traductionnelles des histones.....	32
c. Effets sur l'expression des miARNs.....	33
3. La pollution atmosphérique .....	33
4. Transmission à la descendance de marques épigénétiques.....	34
a. Transmission maternelle .....	34
b. Transmission paternelle .....	36
<b>II. Microbiote intestinal et épigénétique</b> .....	37
1. Microbiote intestinal .....	37
2. Impact du microbiote intestinal sur les marques épigénétiques.....	38
a. Effet de la colonisation intestinale sur les marques épigénétiques .....	38
i. Microbiote intestinal et méthylation de l'ADN .....	38
ii. Microbiote intestinal et modifications post-traductionnelles des histones .....	39
iii. Facteurs bactériens modulant les marques épigénétiques : exemple du LPS.....	40
b. Effets induits par des métabolites produits par le microbiote.....	40
i. Sur la méthylation de l'ADN .....	40
ii. Sur les modifications post-traductionnelles des histones .....	41
<b>III. Modulation des marques épigénétiques par des bactéries pathogènes</b> .....	43
1. Modulation de la méthylation de l'ADN par les bactéries .....	43
a. <i>Helicobacter pylori</i> .....	43
b. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	44
2. Modulation des marques histones par les bactéries .....	45
a. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	45
b. <i>Shigella flexneri</i> .....	45
c. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	46
d. <i>Legionella pneumophila</i> .....	47
e. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	48
f. Autres bactéries modulant les marques histones .....	48

<b>Troisième partie : La maladie de Crohn</b> .....	50
<b>I. La barrière intestinale</b> .....	50
1. Structure et fonctions de la barrière intestinale.....	50
2. Intégrité de l'épithélium intestinal .....	51
<b>II. Généralités sur la maladie de Crohn</b> .....	52
1. Définition et épidémiologie .....	52
2. Physiopathologie de la MC.....	53
a. Perméabilité intestinale et MC.....	53
b. Dérégulations de la réponse immunitaire.....	54
3. Diagnostic de la maladie de Crohn .....	55
a. Symptômes et signes cliniques .....	55
b. Examens endoscopiques et radiologiques.....	55
c. Analyse histologique .....	56
d. Biomarqueurs.....	56
<b>III. Prise en charge thérapeutique de la MC</b> .....	57
<b>IV. Étiologie de la MC</b> .....	59
1. Facteurs génétiques .....	59
a. « NOD-like receptors » (NLRs).....	59
i. <i>NOD2</i> .....	60
- Polymorphismes dans le gène <i>NOD2</i> associés à la MC.....	60
- Conséquences des polymorphismes dans le gène <i>NOD2</i> .....	60
ii. <i>CARD9</i> .....	62
b. Gènes impliqués dans l'autophagie .....	62
i. <i>ATG16L1</i> .....	62
ii. <i>IRGM</i> .....	64
2. Facteurs microbiens .....	65
a. Dysbiose chez les patients .....	65
b. Le microbiote fongique.....	67
c. Le microbiote viral .....	67
d. Bactéries impliquées dans la MC.....	68
i. <i>Yersinia</i> et <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> .....	68
ii. <i>Escherichia coli</i> adhérents et invasifs : AIEC.....	69
- Présentation du pathovar .....	69
- Interaction des AIEC avec l'épithélium intestinal .....	70
- Conséquences de l'interaction des AIEC avec l'épithélium.....	72
- Contrôle de la prolifération des bactéries AIEC .....	73
- Impact d'une infection par les AIEC sur le microbiote .....	74
- Modèles d'étude des AIEC dans la physiopathologie de la MC <i>in vivo</i> .....	75
3. Facteurs environnementaux impliqués dans l'étiologie de la MC.....	77
a. Le tabac.....	77
b. Régime alimentaire.....	78
i. Régime riche en graisses, en sucres et pauvres en fibres .....	78
ii. Additifs alimentaires .....	79
c. Autres facteurs environnementaux .....	80
i. Activité physique .....	80
ii. La vitamine D.....	81
iii. Autres facteurs environnementaux .....	81

4. Épigenétique et maladie de Crohn .....	82
a. ARNs non codants et maladie de Crohn .....	82
i. Expression des miARNs chez les patients atteints de MC .....	82
ii. miARNs et AIEC .....	83
iii. Expression des lncARNs chez les patients atteints de MC .....	84
b. Méthylation de l'ADN et maladie de Crohn.....	84
i. Études de la méthylation de l'ADN sur cellules sanguines.....	84
ii. Études de la méthylation de l'ADN sur biopsies.....	85
iii. Études de la méthylation de l'ADN des cellules souches.....	85
iv. Rôle des molécules donneuses de groupements méthyles .....	86
c. Modifications des marques histones, HDACs et maladie de Crohn .....	86
i. Modifications post-traductionnelles des histones dans la MC.....	86
ii. Acteurs épigénétiques dans la MC .....	87

### **Travail expérimental**

Objectifs du travail de recherche .....	123
Introduction de la publication n°1 .....	126
Commentaire de la publication n°1 .....	158
Résultats complémentaires de la publication n°1 .....	160
Introduction de la publication n°2 .....	172
Commentaire de la publication n°2 .....	190

### **Discussion & Perspectives**

Discussion & Perspectives .....	193
Conclusion générale .....	211

### **Références bibliographiques**

Références bibliographiques .....	212
-----------------------------------	-----

### **Annexes**

## Liste des figures et des tables

---

### Figures

- Figure 1 :** Structure de la chromatine.
- Figure 2 :** Biosynthèse des miARNs.
- Figure 3 :** Méthylation de l'ADN et métabolisme des molécules à un carbone.
- Figure 4 :** Voies de méthylation de l'ADN.
- Figure 5 :** Mécanismes moléculaires impliqués dans la méthylation et la déméthylation de l'ADN.
- Figure 6 :** Modifications post-traductionnelles des histones.
- Figure 7 :** Les acteurs épigénétiques.
- Figure 8 :** Exemple de la régulation de l'expression des gènes par les histones méthyltransférases et les histones déméthylases.
- Figure 9 :** Interaction entre les modifications post-traductionnelles des histones, les protéines « readers » et les protéines « writers » ou « erasers ».
- Figure 10 :** La régulation de l'acétylation des histones influence l'activité transcriptionnelle des gènes.
- Figure 11 :** Classification et structure des domaines des HDACs.
- Figure 12 :** Exemples de la régulation de l'activité des HDACs.
- Figure 13 :** Exemples d'inhibiteurs de HDACs.
- Figure 14 :** Voies impliquées dans la tumorigenèse et régulées par les HDACs.
- Figure 15 :** Rôles des HDACs dans l'homéostasie intestinale.
- Figure 16 :** Effets du régime alimentaire sur le développement des abeilles.
- Figure 17 :** Les exosomes sécrétés par le tissu adipeux viscéral exacerbent la sévérité de la colite *via* des miARNs pro-inflammatoires chez des souris nourries avec un régime High Fat (HF).
- Figure 18 :** Modifications épigénétiques induites par le régime alimentaire et transmises à la descendance : exemple du modèle Agouti.
- Figure 19 :** Distribution et concentration des bactéries le long du tractus digestif de l'Homme.
- Figure 20 :** Arbre phylogénétique du microbiote intestinal humain.
- Figure 21 :** Fonctions physiologiques du microbiote intestinal.
- Figure 22 :** Facteurs affectant la stabilité et la complexité du microbiote intestinal.
- Figure 23 :** Impact du microbiote intestinal sur les marques épigénétiques.
- Figure 24 :** Le microbiote intestinal interagit avec l'épigénome de l'hôte *via* la production de substrats épigénétiques ou de régulateurs des enzymes « writers » / « erasers ».
- Figure 25 :** Les métabolites dérivés du microbiote régulent HDAC3 au niveau intestinal.
- Figure 26 :** Modulations des marques épigénétiques par des bactéries pathogènes.
- Figure 27 :** Mécanismes utilisés par *Listeria monocytogenes* pour cibler la chromatine et induire des modifications épigénétiques.
- Figure 28 :** *Shigella* reprogramme la réponse transcriptionnelle de l'hôte en injectant l'effecteur OspF *via* le système de sécrétion de type 3.
- Figure 29 :** Modulation des marques histones lors d'une infection bactérienne.
- Figure 30 :** Modulation de la phosphorylation de H3S10 par *Streptococcus pneumoniae*.
- Figure 31 :** Effets de l'infection par les *Escherichia coli* uropathogènes (UPEC) sur l'acétylation des histones.
- Figure 32 :** Anatomie de la muqueuse intestinale.
- Figure 33 :** Structure de la couche de mucus en fonction de la localisation.
- Figure 34 :** Le complexe apical de jonction de l'épithélium intestinal.
- Figure 35 :** Lésions endoscopiques de la maladie de Crohn.
- Figure 36 :** Incidence de la maladie de Crohn (MC) et des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) dans le monde.



- Figure 37 :** Le système immunitaire intestinal associé à la muqueuse dans le contexte de la MC.
- Figure 38 :** Localisations et phénotypes de la maladie de Crohn selon la classification de Montréal.
- Figure 39 :** Examens endoscopiques et radiologiques utilisés pour diagnostiquer la maladie de Crohn.
- Figure 40 :** Stratégies thérapeutiques utilisées dans la maladie de Crohn.
- Figure 41 :** Étiologie multifactorielle de la maladie de Crohn.
- Figure 42 :** Prédipositions génétiques dans l'étiologie des MICI.
- Figure 43 :** Voies de signalisation cellulaires induites par l'activation des récepteurs « NOD-like ».
- Figure 44 :** Rôle de NOD2 dans l'homéostasie intestinale et dans le contexte de la maladie de Crohn (MC).
- Figure 45 :** Le processus autophagique.
- Figure 46 :** Impact du variant ATG16L1 sur l'autophagie et l'élimination des bactéries intracellulaires.
- Figure 47 :** Caractéristiques phénotypiques des *Escherichia coli* adhérents et invasifs associés à la MC.
- Figure 48 :** Interaction CEACAM6-FimH.
- Figure 49 :** Le régime High fat/High sugar (HF/HS) favorise la colonisation intestinale par les AIEC.
- Figure 50 :** Impact des émulsifiants alimentaires sur la localisation du microbiote intestinal.
- Figure 51 :** Modèle hypothétique de l'implication du variant IRGM (c.313C>T) dans l'autophagie, l'élimination des bactéries et la maladie de Crohn (MC).
- Figure 52 :** Représentation schématique des études sur la méthylation de l'ADN chez les patients atteints de la MC dans différents types cellulaires.
- Figure 53 :** Altérations épigénétiques observées chez les patients atteints de MC.
- Figure 54 :** Identification du gène *GCNT1* régulé par HDAC1 et HDAC5 et impliqué dans le processus d'entrée des AIEC.
- Figure 55 :** Identification des voies régulées par HDAC1.
- Figure 56 :** Identification des voies régulées par HDAC5.
- Figure 57 :** L'infection par les bactéries AIEC diminue l'activité HDAC et induit des gènes de l'inflammation.
- Figure 58 :** HDAC1 limite la réponse inflammatoire induite par l'infection par les bactéries AIEC.
- Figure 59 :** Les HDACs de classe I limitent la réponse inflammatoire induite par l'infection par les bactéries AIEC.
- Figure 60 :** La déficience pour HDAC5 induit l'expression de gènes impliqués dans la constitution des jonctions cellulaires dans les cellules infectées par les AIEC.
- Figure 61 :** Le régime HF inhibe l'activité HDAC et altère le ratio d'expression HDAC1/HDAC5 dans l'iléon.
- Figure 62 :** Le régime HF inhibe l'expression de gènes impliqués dans la défense de l'hôte au niveau de l'iléon.
- Figure 63 :** L'infection par les AIEC entraîne une diminution du ratio HDAC1/HDAC5, comme le régime HF.
- Figure 64 :** Étude de l'effet combiné du HF et de l'infection sur l'expression des gènes impliqués dans la réponse à l'infection bactérienne.
- Figure 65 :** Schéma du protocole clinique proposé afin d'évaluer l'impact d'un régime Méditerranéen sur la colonisation par les AIEC chez les patients atteints de MC.
- Figure 66 :** Modèle proposé concernant le rôle de HDAC1, HDAC5 et du régime alimentaire de type occidental dans l'implantation des AIEC chez les patients atteints de MC.

## Tables

- Table 1 :** Classification de Montréal.
- Table 2 :** Modèles d'étude de la physiopathologie des AIEC *in vivo*.

## Abréviations

---

2-AA	2-aminoacétophénone	Foxp3	« Forkhead box P3 »
5-caC	5-carboxycytosine		
5-fC	5-formylcytosine	<b>G</b>	
5-hmC	5-hydroxyméthylcytosine	GO	« Gene Ontology »
5-hmU	5-hydroxyméthyluracile	GNAT	« Gcn5-related N-acetyltransferase »
		GSK-3β	« Glycogen synthase kinase-3 beta »
<b>A</b>		<b>H</b>	
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	hASCs	Cellules souches adipeuses humaines
ADN-PK	Protéine kinase dépendante de l'ADN	HAT	Histone acétyltransférase
AGCC	Acides Gras à Chaînes Courtes	HD	Maladie de Huntington
AIEC	<i>Escherichia coli</i> adhérent et invasif	HD5	α-défensine 5
AR	Arthrite Rhumatoïde	HDAC	Histone désacétylase
ARN	Acide RiboNucléique	HDACi	Inhibiteur de HDAC
ASCAs	Anticorps anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HDM	Histone déméthylase
		HF	« High Fat »
ATG	« Autophagy-related gene »	HF/HS	« High Fat/High Sugar »
		HIF-1α	« Hypoxia Inducible Factor 1 subunit alpha »
<b>B</b>		HMT	Histone méthyltransférase
BER	« Base Excision Repair »	HSP	Protéine de choc thermique
BET	« Bromodomain and Extra-Terminal domain »		
BRD4	« Bromodomain-containing protein 4 »	<b>I</b>	
BrdU	Bromodeoxyuridine	IAP	« Intracisternal A Particle »
		IFN	Interféron
<b>C</b>		Ig	Immunoglobuline
CARD	« CASpase Recruitment Domain »	IL	Interleukine
CBP	« CREB Binding Protein »	ILCs	Cellules lymphoïdes innées
CDK	« Cyclin-Dependent Kinase »	IRGM	« Immunity related GTPase M »
CEABAC10	« CarcinoEmbryonic Antigen Bacterial Artificial Chromosome 10 »	ISGs	Gènes stimulés par l'interféron
CEACAM6	« CarcinoEmbryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 6 »	ISWI	« Imitation switch »
CEIs	Cellules Epithéliales Intestinales	<b>J</b>	
CFU	« Colony Forming Unit »	JAK	Janus kinase
CHD	« Chromodomain Helicase DNA-binding »	JAM	« Junctional Adhesion Molecules »
CHI3L1	« Chitinase 3-like-1 »	<b>K</b>	
CK2	Protéine kinase 2	KAT	Lysine acétyltransférase
CMC	CarboxyMéthylCellulose	KDM	Lysine déméthylase
CoA	Coenzyme A	KEGG	« Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes »
CoREST	« Corepressor of REST »	KO	Knock-Out
CRP	Protéine C réactive	<b>L</b>	
<b>D</b>		LF82	Lille France 82
DAMPs	Molécules associées aux dommages cellulaires	LLO	Listériolysine O
DEG	Gènes différentiellement exprimés	lncARN	ARN long non codant
DNMT	ADN méthyltransférase	LPS	Lipopolysaccharide
DSS	« Dextran Sulfate Sodium »	LSD1	« Lysine-specific demethylase 1 »
<b>E</b>		<b>M</b>	
EAE	Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale	MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
EZH1/2	« Enhancer of Zeste Homolog 1 and 2 »	MBP	« Methyl-Binding Protein »
<b>F</b>		MC	Maladie de Crohn
FDA	« Food and Drug Administration »		

MDP Muramyl dipeptide  
miARN Micro ARN  
MICI Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin  
*MtbPRT* Phosphoribosyltransférase de *Mycobacterium tuberculosis*

**N**  
NAD Nicotinamide Adénine Dinucléotide  
NCBI « National Center for Biotechnology Information »  
NETs « Neutrophil Extracellular Traps »  
NF-kB « Nuclear Factor-Kappa B »  
NHEJ « Non-Homologous End-Joining »  
NK « Natural Killer »  
NLR « NOD-Like Receptor »  
NLS « Nuclear Localization Sequence »  
NOD2 « Nucleotide-binding Oligomerization Domain-2 »  
NuRD « Nucleosome Remodeling and Deacetylase »

**O**  
OMPs « Outer Membrane Proteins »  
OMVs « Outer Membrane Vesicles »

**P**  
P80 Polysorbate 80  
PAMPs Molécules associées aux pathogènes  
pANCAs « Perinuclear Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies »  
PBMCs Cellules mononucléaires du sang périphérique  
PCAF « P300-CBP-Associated Factor »  
PHD « Plant homeodomain »  
piARN « Piwi-Interacting » ARN  
PLY Pneumolysine  
PP1/4 Protéine Phosphatase 1/4  
PPAR Proliférateur de peroxyosomes  
PPM1A/B Protéine Phosphatase Magnésium-Dépendante A/B  
PRC2 « Polycomb Repressive Complex 2 »  
PRMT2 Protéine arginine méthyltransférase 2  
PRR « Pattern Recognition Receptors »  
PTPN2 « Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor type 2 »

**R**  
RCH Rectocolite hémorragique  
Reg3 « Regenerating islet-derived protein 3 »  
REST « Repressor Element 1-Silencing Transcription factor »

RISC « RNA-Induced Silencing Complex »

**S**  
SA Spondylarthrite ankylosante  
SAGA « Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase »  
SAHA « Suberoylanilide hydroxamic acid »  
SAM S-adénosylméthionine  
Scr « Scramble »  
SEC Super complexe d'élongation  
SET « Suppressor of variegation, Enhancer of zeste and Trithorax »  
SETD1 « SET Domain containing 1 »  
siARN « Small Interfering » ARN  
Sin3 « Swi-independent 3 »  
SIRT Sirtuine  
SMRT/NCOR « Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptors/Nuclear receptor Corepressor »  
SNP « Single Nucleotide Polymorphism »  
SP Sclérose en Plaques  
SP140 « Speckled Protein 140 »  
STAT « Signal Transducer and Activator of Transcription »  
SWI/SNF « Switch/Sucrose non-fermentable »

**T**  
T4SS Système de sécrétion de type IV  
TDG « Thymine DNA Glycosylase »  
TEM Transition Épithélio-Mésenchymateuse  
TET « Ten-Eleven Translocation »  
TGF « Transforming Growth Factor »  
Th Lymphocyte T helper  
TLR « Toll-Like Receptor »  
TNF « Tumor Necrosis Factor »  
Treg Lymphocytes T régulateurs  
TSA Trichostatine A  
ULK1 « Unc-51 like autophagy activating kinase 1 »

**U**  
UPEC *Escherichia coli* uropathogènes  
UTR « Untranslated region »

**V**  
VDR Récepteur de la vitamine D

**Y**  
YEATS Yaf9, ENL, AF9, Taf14 et Sas5

**Z**  
ZO *Zonula occludens*

## Résumé

---

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI), très invalidante, évoluant par poussées d'intensités et de localisations variables entrecoupées de périodes de rémission clinique. Cette maladie est incurable, seuls des traitements symptomatiques sont disponibles à ce jour pour soulager les patients. Concernant l'étiologie de la MC, elle est multifactorielle, résultant de l'interaction complexe entre des prédispositions génétiques, des facteurs environnementaux et des altérations de la composition du microbiote. Le régime alimentaire de type occidental, enrichi en sucres, en graisses, en aliments transformés et pauvre en fibres, est un des principaux facteurs de l'environnement mis en cause dans le développement de la MC. De plus, des souches particulières d'*Escherichia coli*, les *E. coli* adhérents et invasifs (AIEC), colonisent anormalement la muqueuse iléale des patients atteints de MC *via* des mécanismes qui n'ont pas été totalement caractérisés. Depuis quelques années, un intérêt nouveau s'est porté sur l'implication des facteurs épigénétiques dans la pathogenèse de la MC. Des altérations des niveaux d'acétylation des histones ou encore une diminution de l'expression des histones désacétylases (HDACs) ont notamment été rapportées chez les patients atteints de MC. Ainsi, l'objectif principal de cette thèse était de mieux comprendre l'interaction AIEC-épithélium intestinal en se concentrant sur des facteurs épigénétiques et environnementaux.

Grâce à des études *in vitro* ainsi qu'à des validations *in vivo* et dans une large cohorte de patients atteints de MC, HDAC1 et HDAC5 ont été identifiées comme des acteurs centraux et antagonistes de la régulation de la colonisation intestinale par les Entérobactéries et les AIEC. Des analyses transcriptomiques réalisées sur des cellules transfectées avec des siARNs dirigés contre HDAC1 et HDAC5 ont révélé le rôle de HDAC1 dans le contrôle de la réponse inflammatoire et dans la formation du cytosquelette d'actine ainsi que celui de HDAC5 dans la perméabilité paracellulaire. Suite à la consommation d'un régime enrichi en graisses (HF), il a été observé une diminution de l'activité HDAC globale et une augmentation de l'expression de HDAC5, qui sont des conditions favorisant l'entrée des AIEC dans les cellules épithéliales intestinales. Aussi, suite à une nouvelle analyse transcriptomique, une répression des gènes impliqués dans la reconnaissance et la prise en charge des bactéries a été mise en évidence chez les souris nourries avec le régime enrichi, suggérant que le régime HF créerait un microenvironnement spécifique favorable à l'implantation des bactéries AIEC au niveau de la muqueuse iléale. Il a également été montré que les bactéries AIEC étaient capables, dans ce contexte, de moduler l'épigénome à leur avantage, afin de promouvoir leur propre colonisation. Ainsi, l'ensemble des données obtenues suggèrent que le ciblage de HDAC5, tout comme un rééquilibrage alimentaire, pourraient être des stratégies intéressantes pour limiter la colonisation intestinale par les bactéries AIEC chez les patients atteints de MC.

Au cours de ma thèse, j'ai également travaillé sur la mise au point d'un nouveau modèle murin pour l'étude de l'interaction AIEC-épithélium intestinal : le modèle Vill-*hCC6*, qui permet de reproduire l'expression iléale anormale du récepteur *CEACAM6*, sur lequel les AIEC se fixent majoritairement. Grâce notamment à l'observation que les bactéries AIEC persistaient préférentiellement dans l'intestin des animaux transgéniques, nous avons montré que le modèle Vill-*hCC6* pouvait constituer un bon modèle préclinique de MC iléale. À l'avenir, il pourra permettre de mieux comprendre le rôle des AIEC dans la MC mais également de développer et tester de nouvelles molécules et stratégies pour le ciblage spécifique des bactéries AIEC implantées dans la muqueuse iléale des patients.

## Présentation du manuscrit

---

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) caractérisée par une inflammation chronique du système digestif. C'est une maladie invalidante, qui évolue par poussées inflammatoires entrecoupées de périodes de rémission clinique. L'étiologie de la MC étant complexe et pas encore entièrement connue, aucun traitement curatif n'est disponible à ce jour. Cette maladie serait le résultat de l'interaction entre des prédispositions génétiques, des facteurs environnementaux et des altérations de la composition du microbiote intestinal. Concernant les modifications du microbiote intestinal, il a été démontré que les bactéries *Escherichia coli* adhérentes et invasives (AIEC) étaient trouvées avec une plus forte prévalence au niveau de la muqueuse iléale des patients atteints de MC sans que les mécanismes moléculaires menant à cette colonisation anormale n'aient été totalement caractérisés. Aussi, depuis quelques années, un autre facteur est étudié comme pouvant jouer un rôle dans la pathogenèse de la MC : l'épigénétique.

Ainsi, l'objectif de ma thèse était de mieux comprendre l'interaction entre les bactéries AIEC et l'épithélium intestinal en se concentrant sur des facteurs épigénétiques et environnementaux. Ce travail de recherche s'est notamment articulé autour de 2 axes :

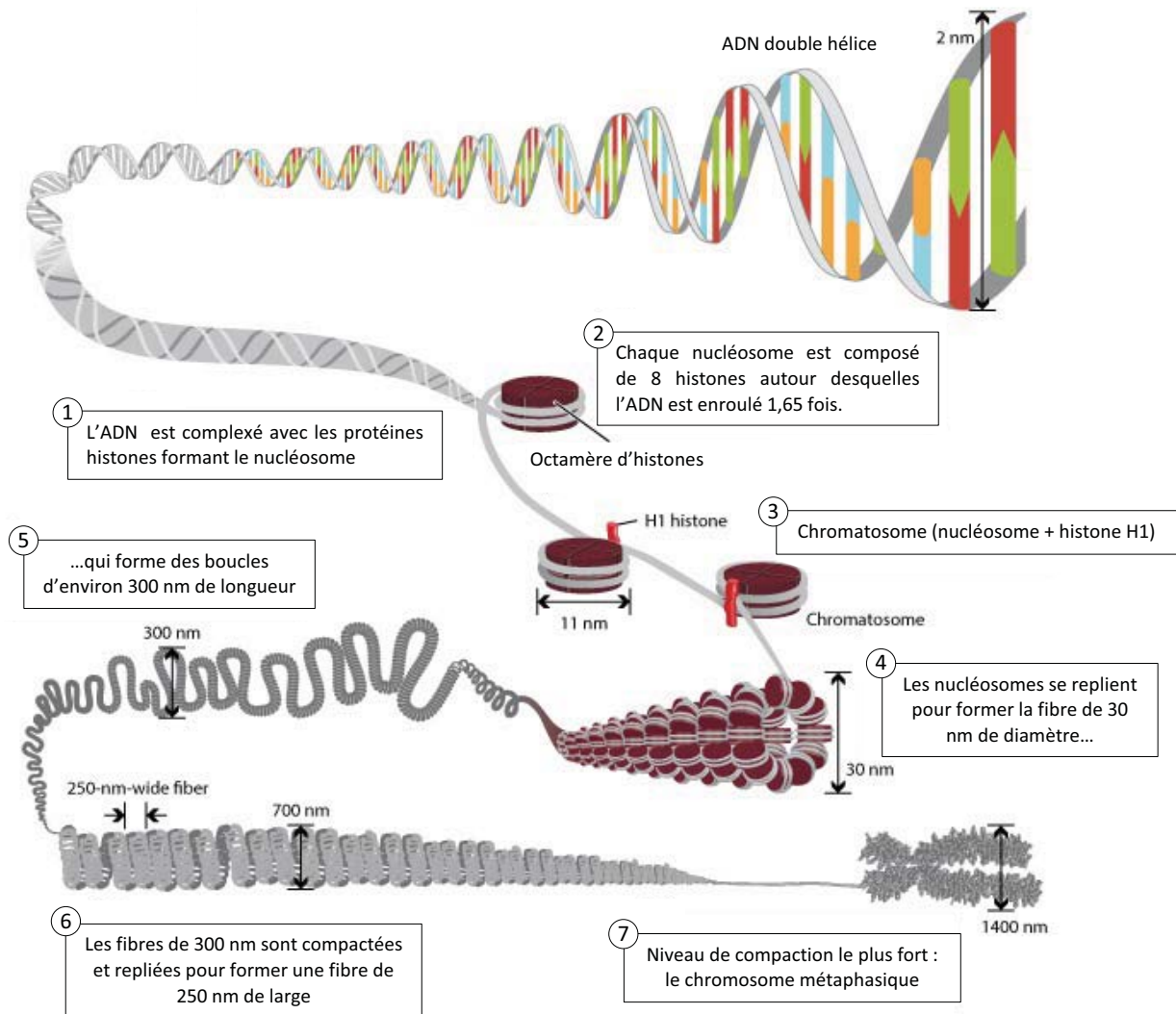
- **Identification d'acteurs épigénétiques impliqués dans le contrôle de l'infection des cellules épithéliales intestinales par les AIEC.** Cet axe a été structuré en 3 parties :
  - o Étude du rôle des histones désacétylases (HDACs) dans le mécanisme d'infection des cellules épithéliales intestinales par les bactéries AIEC
  - o Identification des mécanismes moléculaires sous-jacents de la régulation HDAC-dépendante de la colonisation intestinale par les AIEC
  - o Effets du régime occidental sur les marques épigénétiques et l'expression des gènes au niveau iléal
- **Mise au point d'un nouveau modèle murin pour l'étude de l'interaction AIEC-épithélium intestinal.**

Concernant la structure du manuscrit, l'étude bibliographique se divisera en 3 grandes parties. Dans une première partie seront décrits les mécanismes de la régulation épigénétique des gènes avec un intérêt particulier adressé à l'acétylation des histones et à l'importance des HDACs en conditions physiologiques et pathologiques. La seconde partie s'intéressera à l'impact de l'environnement ou des micro-organismes sur les marques épigénétiques. La troisième partie sera, quant à elle, consacrée aux connaissances actuelles sur la maladie de Crohn, notamment sur les différents facteurs impliqués dans l'étiologie de la maladie. Le travail expérimental sera ensuite présenté sous forme de 2 articles scientifiques auxquels seront adossés un commentaire et d'éventuels résultats complémentaires. Enfin, le manuscrit se terminera par une discussion générale sur l'ensemble du travail présenté.



# Étude bibliographique





**Figure 1 : Structure de la chromatine.**

L'ADN chromosomique est empaqueté dans les noyaux à l'aide de protéines histones. Ces protéines chargées positivement adhèrent fortement à l'ADN, chargé négativement, formant les nucléosomes. Les nucléosomes se replient pour créer une fibre de chromatine de 30 nm de diamètre, qui forme des boucles d'environ 300 nm de longueur. Les fibres de 300 nm sont compactées et repliées pour former une fibre de 250 nm de large qui, après un étroit repliement, génère une chromatide d'un chromosome (adaptée de Annunziato *et al.*, 2008).

## Première partie :

# Régulation épigénétique de l'expression des gènes

---

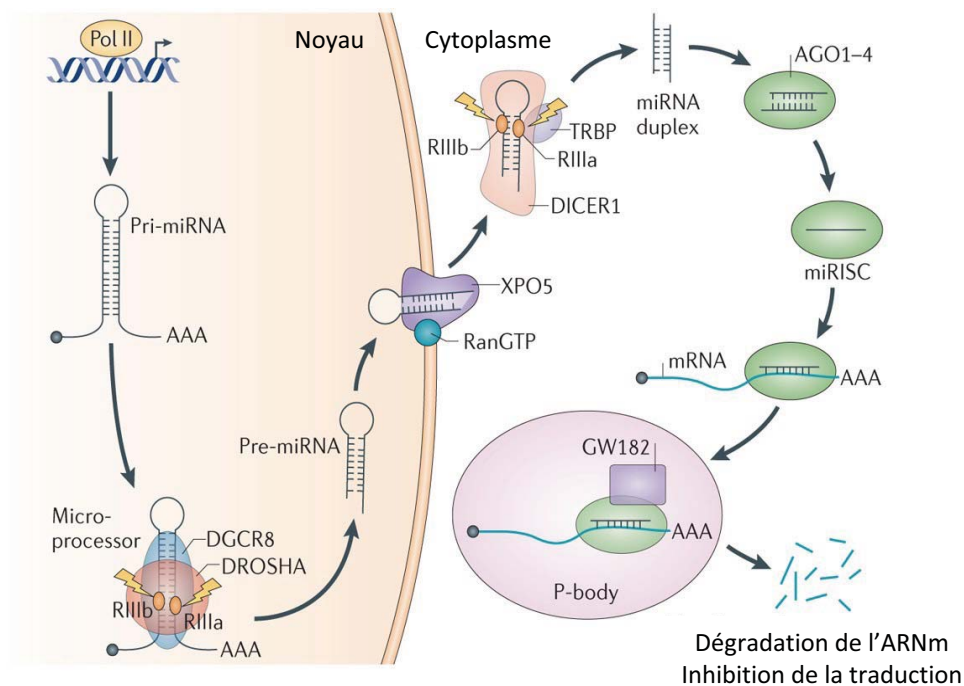
### I. Structure de l'ADN

Le génome humain contient approximativement 6 milliards de paires de bases d'ADN organisées en 23 paires de chromosomes. Une paire de base mesure environ 0,34 nm de long ce qui fait que chaque cellule diploïde contient l'équivalent de 2 mètres d'ADN. À l'échelle du corps entier, cela représente 100 billions de mètres d'ADN par être humain. Afin de contenir la totalité du matériel génétique dans le noyau d'une cellule, l'ADN doit être fortement compacté. Pour cela, la double hélice d'ADN est enroulée autour des protéines histones formant un premier niveau de compaction : le nucléosome. Les histones (H1, H2A, H2B, H3 et H4) sont des protéines chargées positivement qui se lient de manière très étroite à l'ADN chargé négativement formant ainsi la chromatine. Le nucléosome est formé d'un octamère d'histones (2 copies de H2A, H2B, H3 et H4) autour duquel sont enroulées 146 paires de base d'ADN. L'addition de l'histone H1 permet d'enrouler 20 paires de base supplémentaires formant le chromatosome. L'enchaînement des nucléosomes forme la fibre de chromatine de 30 nm de diamètre. Des niveaux de compaction supplémentaires de cette fibre vont se mettre en place *via* la formation de boucles et de bobines jusqu'à former le chromosome métaphasique qui correspond au niveau de compaction de l'ADN le plus fort (**Figure 1**) (Annunziato, 2008).

Au sein du noyau, il existe différents types de chromatine : l'euchromatine et l'hétérochromatine. L'euchromatine est une forme relâchée, favorable à l'expression des gènes et présente dans des locus génomiques riches en gènes actifs. L'hétérochromatine est une forme condensée, transcriptionnellement moins active, principalement présente au niveau des péricentromères et des télomères ainsi qu'au niveau de régions géniques réprimées. Il existe un autre type de chromatine présent au niveau des centromères, la chromatine centromérique, où l'histone H3 est remplacée par le variant CENP-A (Morrison & Thakur, 2021).

Des processus comme la transcription et la réplication requièrent la séparation des 2 brins d'ADN pour que les polymérases aient accès à l'ADN. L'accès à la chromatine peut être favorisé par des complexes de remodelage de la chromatine qui vont exposer l'ADN aux enzymes ainsi que par des modifications post-traductionnelles des histones.

Notre système génomique est complexe et finement régulé. La génétique étudie les changements dans la séquence en acides nucléiques, les mutations, qui entraînent des modifications de l'expression des gènes. De manière différente, l'épigénétique s'intéresse à l'étude des changements dans l'activité des gènes sans qu'il n'y ait de changement de la séquence ADN.



**Figure 2 : Biosynthèse des miARNs.**

Les gènes des miARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II dans le noyau résultant en la génération de pri-miARNs (« primary miARNs »). Les long pri-miARNs sont ensuite clivés par la ribonucléase III DROSHA et son co-facteur DGCR8 pour produire des précurseurs de miARNs (« pre-miARNs ») de 60-70 nucléotides. Les pre-miARNs sont ensuite exportés du noyau vers le cytoplasme grâce à l'exportine 5 (XPO5) et clivés par la ribonucléase III, DICER, produisant ensuite des miARNs matures. Un brin du miARN mature, chargé dans le complexe RISC contenant une protéine de la famille Argonaute (AGO), cible l'ARNm en interagissant avec la région 3'-UTR menant à la dégradation de l'ARNm ou à l'inhibition de sa traduction dans les P-bodies (compartiment cytosolique stockant les ARNm non traduits) (adaptée de Lin and Gregory, 2015).

## II. Les différentes régulations épigénétiques connues

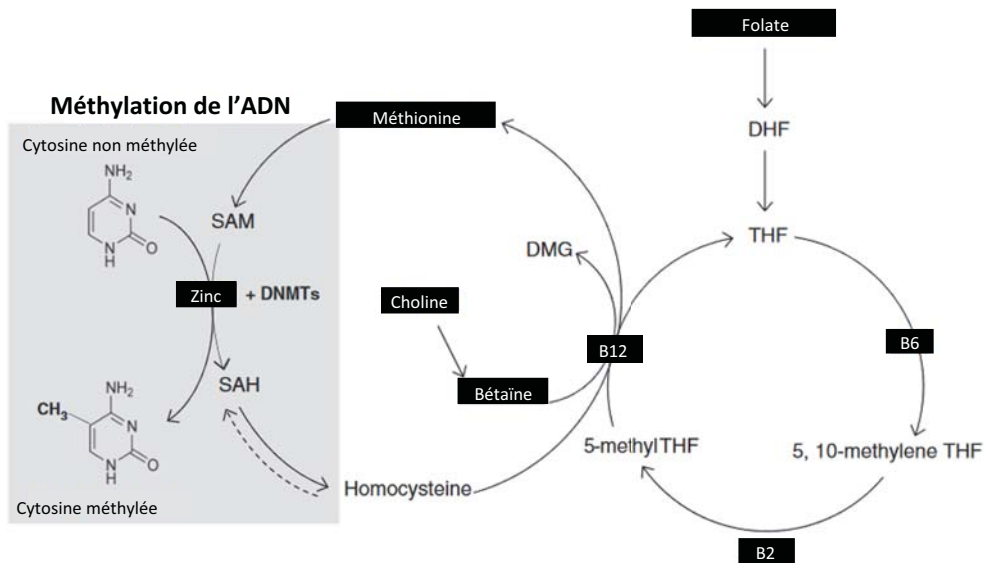
Les marques épigénétiques peuvent être définies comme des modifications transmissibles lors des divisions cellulaires qui régulent l'expression des gènes sans qu'il n'y ait de changement de la séquence en acides nucléiques. Il existe différents types de modifications épigénétiques : les ARNs non codants, la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones.

### 1. ARNs non codants : les miARNs

Les ARNs non codants correspondent aux ARNs qui ne sont pas traduits en protéines. Parmi ces ARNs non codants, certains ont des rôles de régulation et sont divisés en 2 catégories basées sur leur taille : les petits ARNs non codants comprenant les miARNs, les siARNs et les piARNs, et les ARNs longs non codants (lncARNs). Parmi les ARNs non codants, les miARNs sont les plus étudiés dans le contexte de la maladie de Crohn, c'est pour cela qu'ils seront détaillés dans cette partie.

Le premier miARN a été identifié chez *Caenorhabditis elegans* au niveau du locus *lin-4* dans les années 1990 (R. C. Lee *et al.*, 1993). Cependant, il faudra attendre plusieurs années avant que la fonction régulatrice des miARNs ne soit appréciée. Depuis, des milliers de miARNs ont été identifiés chez diverses espèces (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011).

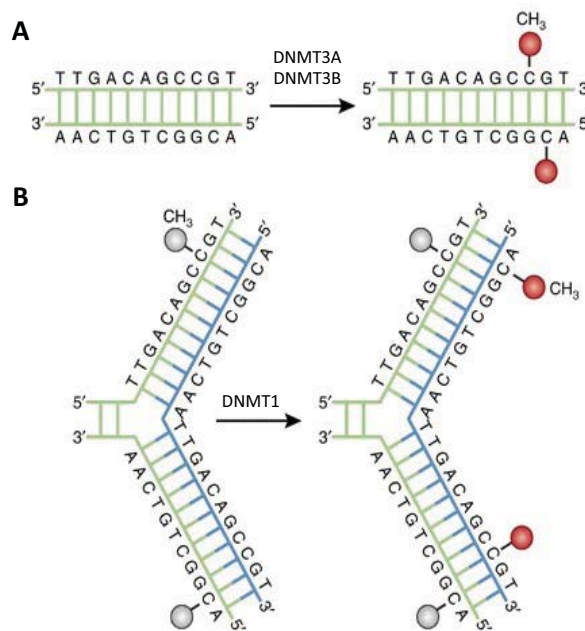
Les gènes des miARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II dans le noyau générant des pri-miARNs (« primary miARNs »). Les long pri-miARNs sont ensuite clivés par « microprocessor », qui contient la ribonucléase III DROSHA et son cofacteur essentiel DGCR8, libérant un pre-miARN de 60-70 nucléotides (« precursor miARN »). Le pre-miARN est par la suite exporté du noyau vers le cytoplasme *via* l'exportine 5 et clivé par DICER 1, une ribonucléase III, associée à TRBP générant un duplex d'une vingtaine de nucléotides. Un brin du miARN mature est lié par une protéine de la famille Argonaute et retenu dans le complexe RISC. Le miARN va ensuite interagir, dans la plupart des cas, avec la région 3'UTR (« 3' untranslated region ») des ARNm résultant en la dégradation de l'ARNm complémentaire ou en l'inhibition de la traduction en fonction de la complémentarité (**Figure 2**) (Rupaimoole & Slack, 2017). Chaque miARN peut cibler des centaines d'ARNm dans un type cellulaire donné et un seul ARNm est la cible de plusieurs miARNs. La transcription des pri-miARNs peut être régulée négativement ou positivement par différents facteurs tels que des facteurs de transcription, des « enhancers » ou des « silencers ». Les quantités de miARNs et leur activité peuvent aussi être régulés par des modifications post-traductionnelles affectant les enzymes de biosynthèse des miARNs, notamment, p38 phosphoryle DROSHA réduisant l'interaction avec DGCR8 et diminuant les niveaux de miARNs (Q. Yang *et al.*, 2015). Des mutations dans les gènes codant pour ces enzymes (DICER, DROSHA, exportine ou Argonaute) ont été rapportées dans divers cancers incluant le neuroblastome ou le cancer des ovaires (Annese *et al.*, 2020).



**Figure 3 : Méthylation de l'ADN et métabolisme des molécules à un carbone.**

Le substrat de la méthylation de l'ADN est la S-adenosylméthionine (SAM) produite lors du métabolisme de la méthionine et du folate. Le folate, la vitamine B12, la méthionine, la choline et la bétaïne sont considérés comme des donneurs de groupement méthyles, importants dans le maintien des marques de méthylation de l'ADN (adaptée de Laubach *et al.*, 2018).

DMG : Diméthylglycine, DNMTs : ADN méthyltransférases, SAH : S-adenosylhomocystéine, SAM : S-adenosylméthionine, THF : Tétrahydrofolate.



**Figure 4 : Voies de méthylation de l'ADN.**

Les DNMTs catalysent le transfert d'un groupement méthyl provenant de SAM vers le carbone 5 d'un résidu cytosine.

**A : Méthylation *de novo* de l'ADN.** DNMT3A et DNMT3B sont responsables de la méthylation *de novo* de l'ADN, elles transfèrent un groupement méthyl (rouge) sur l'ADN « nu ».

**B : Maintien de la méthylation de l'ADN.** DNMT1 est responsable du maintien de la méthylation de l'ADN au cours des divisions cellulaires. Durant la réplication, le brin d'ADN parental conserve le profil de méthylation original (gris). DNMT1, localisée au niveau de la fourche de réplication, répète le modèle de méthylation original en ajoutant des groupements méthyles sur le brin néo-synthétisé (bleu) (adaptée de Moore *et al.*, 2013).

DNMT : ADN méthyltransférase, SAM : S-adenosylméthionine.

Les validations fonctionnelles des miARNs ont montré qu'ils jouaient des rôles importants dans la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire, ainsi que dans la réponse immunitaire innée ou adaptative et des altérations de leur niveau d'expression contribuent à l'apparition de pathologies telles que des cancers, les maladies cardiovasculaires, les hépatites, l'athérosclérose ou encore le diabète (Raisch *et al.*, 2013; Rupaimoole & Slack, 2017). Par exemple, les familles de miARNs let-7, miR-34 ou miR-200, qui ont des fonctions suppresseurs de tumeurs, sont sous-exprimés dans de nombreux cancers tandis que des miARNs avec une fonction oncogénique tels que miR-21 ou miR-155 présentent une plus forte expression dans différents cancers (Rupaimoole & Slack, 2017).

Du fait de leur rôle dans la régulation de l'expression des gènes, des stratégies thérapeutiques utilisant les miARNs ont été développées. Il peut s'agir de miARNs « mimics » qui sont des molécules d'ARN double brin correspondant à la séquence du miARN cible afin de reconstituer son expression perdue dans les pathologies. À l'inverse, les antagomiRs ou anti-miRs sont des molécules simple brin complémentaire du miARN cible, la fixation de l'antagomiR menant à l'inhibition et au blocage de la fonction du miARN. Ainsi, des miARNs mimics ou des antagomiR ont été ou sont en cours d'études dans des modèles pré-cliniques ou cliniques pour évaluer leur potentiel thérapeutique dans diverses pathologies telles que l'hépatite C ou le cancer (Hanna *et al.*, 2019; Rupaimoole & Slack, 2017).

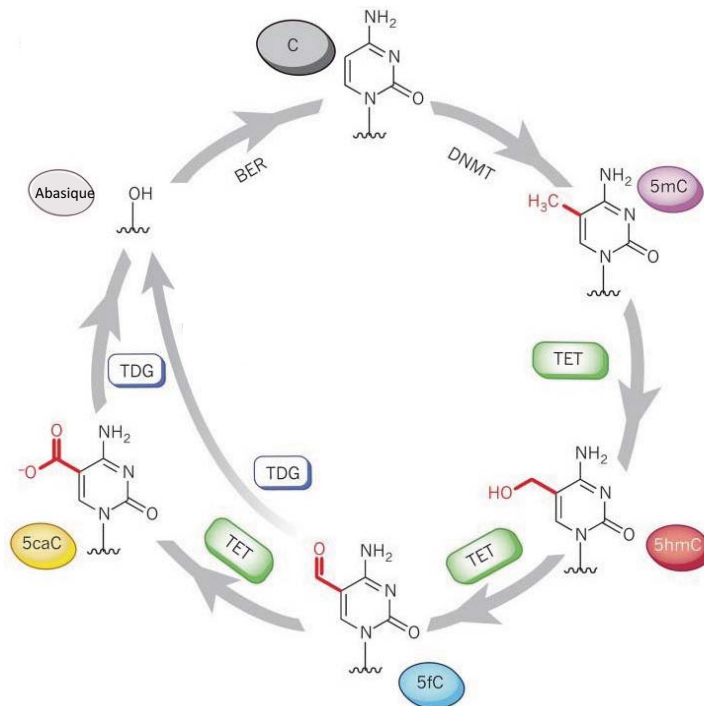
## 2. Méthylation de l'ADN

Historiquement, la méthylation de l'ADN a été découverte dans les années 1940, notamment avec l'observation de cytosine modifiée dans un thymus de veau (Hotchkiss, 1948). Toutefois, il a fallu attendre les années 1980 pour qu'il soit démontré que la méthylation de l'ADN est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes.

### a. Acteurs impliqués dans la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN, majoritairement réalisée au niveau des dinucléotides CpG, est catalysée par la famille des ADN méthyltransférases (DNMTs), qui transfèrent un groupement méthyl au niveau du carbone 5 de la cytosine générant la 5-méthylcytosine. La S-adénosylméthionine (SAM) est le donneur de groupement méthyl universel pour la réaction de méthylation de l'ADN. La SAM est produite lors du métabolisme des molécules à un carbone, qui comprend les cycles du folate et de la méthionine et est dépendant de plusieurs enzymes ainsi que de la présence de choline, vitamine B12 et bétaïne (**Figure 3**) (Anderson *et al.*, 2012). Il existe différentes DNMTs. DNMT3A et DNMT3B sont responsables de la méthylation *de novo* tandis que DNMT1 est active lors de la réplication de l'ADN pour maintenir la méthylation (**Figure 4**). Localisée au niveau de la fourche de réplication, elle appose des groupements méthyles sur les cytosines du brin néo-synthétisé et non-méthylé pour reproduire le profil de méthylation original permettant le maintien de la méthylation de l'ADN lors des divisions cellulaires. Il existe une autre DNMT, DNMT3L dépourvue de domaine catalytique mais qui s'associe

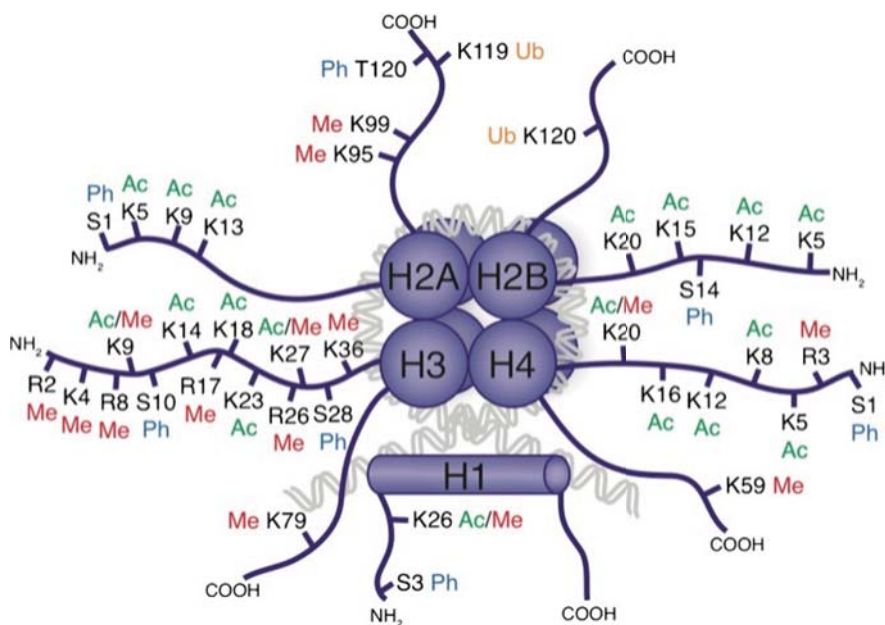




**Figure 5 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la méthylation et la déméthylation de l'ADN.**

Les enzymes TETs hydroxylent les 5-méthylcytosine (5mC) aboutissant à la formation de 5-hydroxyméthylcytosines (5hmC). Les 5hmC peuvent être oxydées, toujours par les enzymes TETs, pour générer des 5-formylcytosines (5fC) et des 5-carboxycytosines (5caC). Ensuite, 5fC et 5caC vont être excisées par TDG générant des sites abasiques et remplacés par une cytosine non méthylée *via* le système de réparation de l'ADN BER (adaptée de Kohli and Zhang, 2013).

TDG: Thymine DNA Glycosylase, BER: Base Excision Repair.



**Figure 6 : Modifications post-traductionnelles des histones.**

Représentation des principales modifications post-traductionnelles des histones (adaptée de Zhao *et al.*, 2013).

Ac : Acétylation, Me : Méthylation, Ph : Phosphorylation, Ub : Ubiquitination.

à DNMT3A et DNMT3B et stimule leur activité méthyltransférase (Moore *et al.*, 2013). La méthylation *de novo* se produit suite à la reconnaissance de la présence ou absence de facteurs de transcription ou au niveau de régions génomiques présentant des modifications de la chromatine, par exemple, DNMT3B va reconnaître la marque H3K36me3 (tri-méthylation de la lysine 36 de l'histone H3) au niveau de gènes transcrits menant à son recrutement et à la méthylation de l'ADN au niveau de ces régions (Baubec *et al.*, 2015; Kibe *et al.*, 2021; Morselli *et al.*, 2015; Weinberg *et al.*, 2019).

La méthylation de l'ADN est généralement associée à l'inhibition de l'expression des gènes, particulièrement lorsque des îlots CpG (comprenant un grand nombre de dinucléotides CpG) localisés dans des promoteurs sont méthylés. En effet, cette méthylation massive des promoteurs empêche la fixation de facteurs de transcription ou permet le recrutement des répresseurs transcriptionnels tels que les methyl-binding proteins (MBP) qui reconnaissent les cytosines méthylées, ou des enzymes impliquées dans le remodelage et la condensation de la chromatine (Moore *et al.*, 2013).

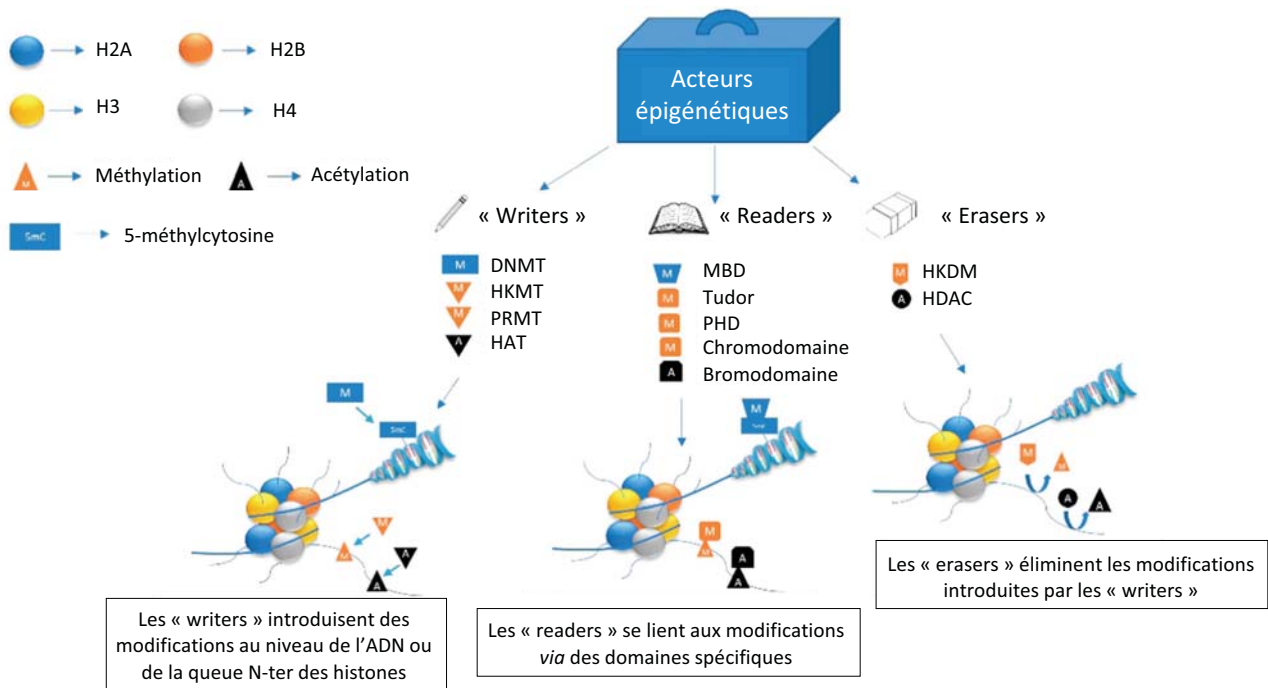
### **b. Voies de déméthylation de l'ADN**

Deux voies différentes de déméthylation de l'ADN ont été identifiées : une voie passive et une voie active. L'absence ou la baisse d'activité des DNMTs, surtout DNMT1, va conduire à la déméthylation passive de l'ADN au cours des réplifications successives. Contrairement à la déméthylation passive, la déméthylation active requiert l'action de plusieurs enzymes. Les enzymes « Ten-eleven translocation » (TETs) vont hydroxyler les 5-méthylcytosines formant une 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmC). Les 5-hmC peuvent ensuite être oxydées par les enzymes TETs en 5-formylcytosine (5-fC) puis en 5-carboxycytosine (5-caC). Un autre mécanisme va entraîner la déamination de 5hmC par AIED/APOBEC pour former une 5-hydroxyméthyluracile (5hmU). Les produits de chaque voie (5hmU, 5-fC ou 5-caC) vont être reconnus par les protéines TDG et/ou SMUG1 appartenant au système de réparation de l'ADN « Base excision repair » (BER) et remplacés par une cytosine non méthylée (**Figure 5**) (Kohli & Zhang, 2013; X. Wu & Zhang, 2017).

## **3. Modifications post-traductionnelles des histones**

### **a. Les différentes modifications post-traductionnelles des histones**

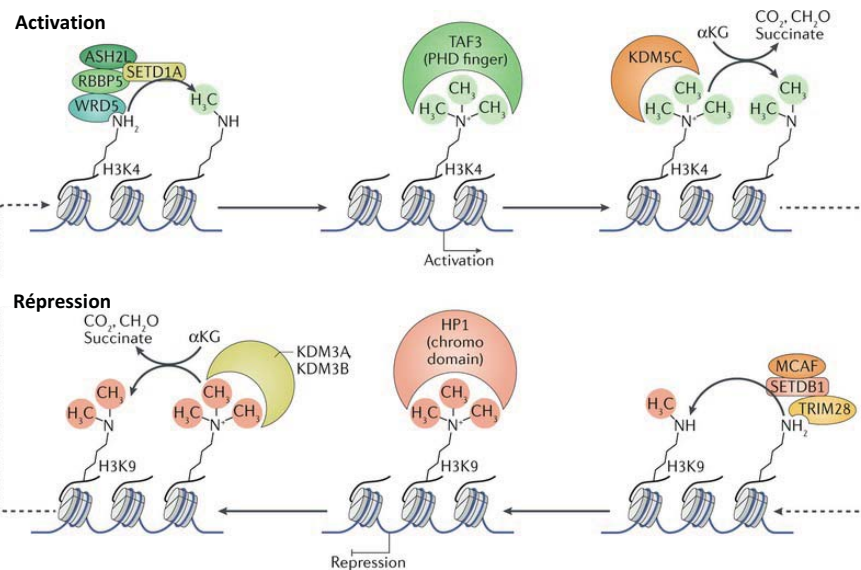
Les histones présentent des queues N- et C-terminales dépassant du core du nucléosome qui peuvent subir des modifications post-traductionnelles. C'est Vincent Allfrey qui a en premier démontré que les histones pouvaient être modifiées post-traductionnellement dans les années 1960 (Allfrey *et al.*, 1964). Il existe de nombreux types de modifications des histones impliquant différents groupements chimiques plus ou moins complexes. Les modifications les plus connues et les mieux caractérisées sont les acétylations, les méthylations, les phosphorylations, l'ubiquitination et la sumoylation (**Figure 6**) (Bannister & Kouzarides, 2011). D'autres modifications, moins fréquentes, existent telles que l'hydroxylation, la crotonylation, la succinylation, la formylation, la butyrylation, la propionylation ou



**Figure 7 : Les acteurs épigénétiques.**

Représentation des acteurs épigénétiques « writers », « readers » et « erasers » (adaptée de Biswas and Rao, 2018).

DNMT : ADN méthyltransférase, HAT : Histone acétyltransférase, HDAC : Histone désacétylase, HKDM : Histone lysine déméthylase, HKMT : Histone lysine méthyltransférase, MBD : Methyl-CpG-binding domain, PHD : Plant homeodomain, PRMT : Arginine méthyltransférase.



**Figure 8 : Exemple de la régulation de l'expression des gènes par les histones méthyltransférases et les histones déméthylases.**

Le complexe méthyltransférase SETD1A (SETD1 possédant l'activité catalytique, ASH2L, RBBP5 et WRD5 étant des partenaires protéiques) dépose la marque activatrice H3K4me<sub>3</sub> au niveau des promoteurs des gènes. La marque H3K4me<sub>3</sub> est reconnue par la protéine TAF3 (« reader ») possédant un domaine PHD qui se lie à la lysine méthylée. L'activation du gène peut être reversée via l'élimination du groupement méthyl par la déméthylase KDM5C qui utilise l' $\alpha$ -cétoglutarate ( $\alpha$ -KG) comme co-facteur. La répression d'un gène peut être établie par le dépôt de la marque H3K9me<sub>3</sub> par le complexe méthyltransférase SETDB1 (la sous-unité catalytique SETDB1 est associée avec le régulateur MCAF et la protéine TRIM28). La marque H3K9me<sub>3</sub> reconnue est par le chromodomaine de la protéine HP1 et peut être éliminée par les déméthylases KDM3A ou KDM3B en présence d' $\alpha$ -KG (adaptée de Jambhekar *et al.*, 2019).

$\alpha$ -KG :  $\alpha$ -cétoglutarate, KDM : Lysine déméthylase, PHD : Plant homeodomain, SET : Suppressor of variegation, Enhancer of zeste and Trithorax.

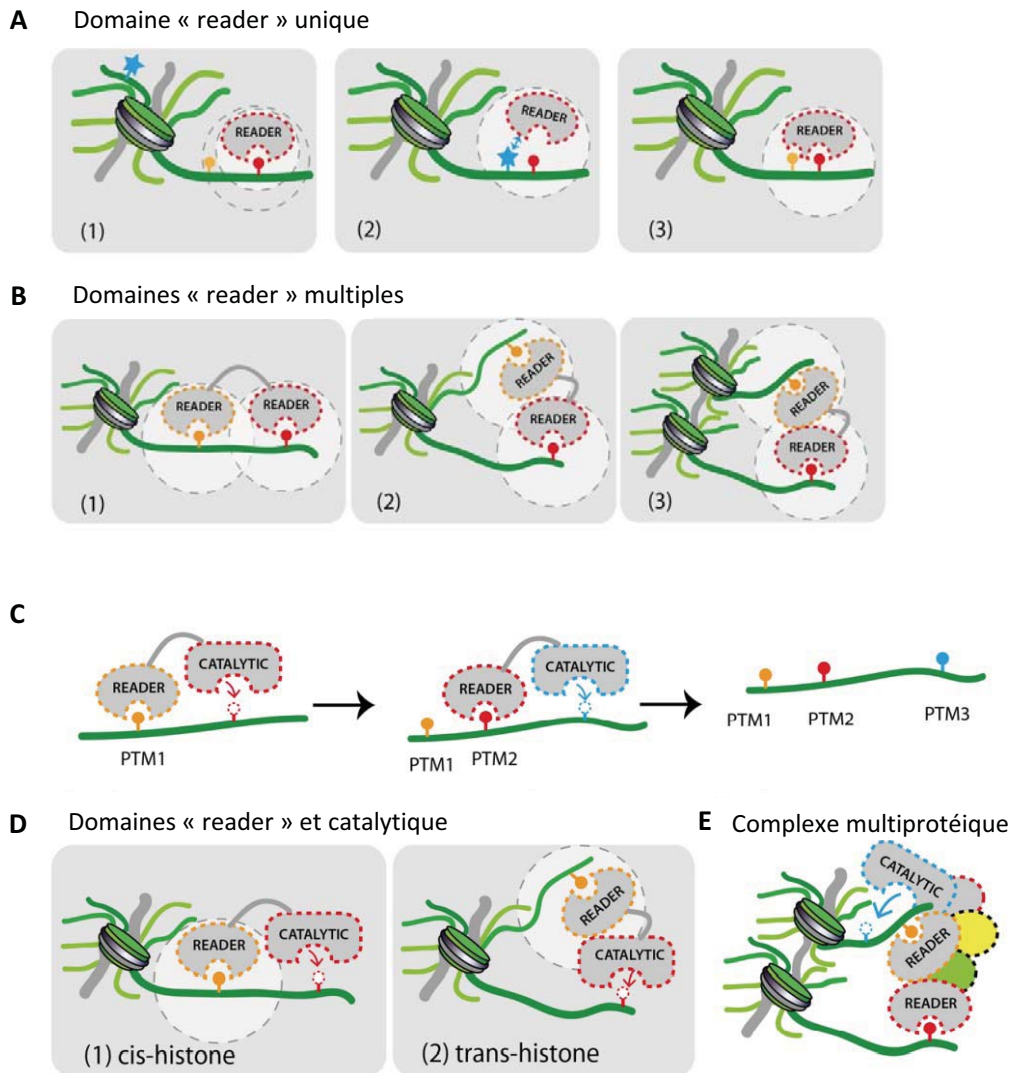
encore la lactylation découverte récemment (Arnaudo & Garcia, 2013; D. Zhang *et al.*, 2019). Aussi, les histones peuvent être modifiées au niveau d'autres régions que les queues N-ter et C-ter, notamment au niveau de la surface latérale des domaines globulaires. Par exemple, la lysine 79 de l'histone H3 (H3K79) peut être méthylée et cette marque est associée à une activation de l'expression des gènes (Lawrence *et al.*, 2016). La diversité de ces groupements ainsi que leur position sur les histones constituent un code régulant l'état de compaction de la chromatine et l'expression des gènes, on parle du code histone.

### **b. Acteurs impliqués dans la modification post-traductionnelle des histones**

Les acteurs épigénétiques régulant les modifications post-traductionnelles des histones peuvent être catégorisés en « writers », correspondant aux enzymes responsables de l'apposition des marques, en « readers », les protéines possédant un domaine qui reconnaît spécifiquement les modifications et les « erasers », les enzymes qui éliminent les modifications (**Figure 7**). Par exemple, concernant la méthylation des histones, elle peut se faire sur des résidus lysine ou arginine, principalement au niveau de l'histone H3, et existe sous trois formes : mono-, di- ou triméthylation. Les histones méthyltransférases (HMTs, « writers ») sont responsables de l'ajout de groupement méthyles sur les histones. Elles sont diverses, l'activité catalytique réside souvent dans leur domaine SET, et elles sont capables de générer plusieurs degrés de méthylation et présentent des spécificités de résidus. En effet, la famille de SETD1 va préférentiellement apposer des marques de méthylation activatrices au niveau de H3K4 tandis que EZH1/2 du complexe PRC2 va être responsable de la formation de marques de méthylation répressives sur H3K27. La méthylation des histones régule l'expression des gènes *via* le recrutement d'activateurs ou de répresseurs transcriptionnels. Aussi, les méthyltransférases SUV39H1 et SUV39H2 régulent la triméthylation de H3K9 au niveau de l'hétérochromatine péricentrique tandis que G9a et GLP régulent H3K9me1/2 au niveau de l'euchromatine. Les histones déméthylases (HDMs) présentent aussi des spécificités de résidus, LSD1 déméthylant préférentiellement H3K4 et H3K9 tandis que KDM4A déméthyle H3K9 et H3K36. Les histones méthyltransférases et déméthylases agissent souvent au sein de larges complexes protéiques. Les marques de méthylation peuvent être reconnues par des protéines possédant des domaines PHD, Tudor ou des chromodomains et ces domaines « readers » peuvent être présents dans les « writers », « erasers » ou chez les partenaires protéiques associés à ces enzymes au sein des complexes (**Figure 8**) (Jambhekar *et al.*, 2019).

### **c. Conséquences des modifications post-traductionnelles des histones**

Les modifications des histones affectent l'expression des gènes de deux manières différentes. Elles peuvent directement moduler la structure du nucléosome ou altérer la compaction de la chromatine. En particulier, l'acétylation et la phosphorylation des histones atténuent les interactions électrostatiques entre histones et ADN, facilitant l'accès des facteurs de transcription à l'ADN (Fenley *et al.*, 2010). Par exemple, la marque H4K16ac favorise une structure ouverte de la chromatine en bloquant le repliement



**Figure 9 : Interaction entre les modifications post-traductionnelles des histones, les protéines « readers » et les protéines « writers » ou « erasers ».**

**A** : Reconnaissance des modifications post-traductionnelles des histones (PTMs) par les protéines « readers » montrant qu'elle peut être influencée par les autres marques.

**B** : Interaction entre les protéines « readers » en tandem et les PTMs. Cette interaction peut être en (1) cis-histone, quand les PTM sont sur la même protéine histone, en (2) trans-histone (intranucléosome), quand les modifications sont sur 2 protéines histones différentes au sein d'un même nucléosome ou en (3) trans-histone (internucléosome), quand les modifications sont sur 2 protéines différentes au sein de 2 nucléosomes différents.

**C** : Modèle montrant comment les complexes comportant des domaines « reader » et catalytique (« writer » ou « eraser ») interagissent avec les PTMs pour créer le code histone.

**D** : L'activité catalytique peut être guidée par les domaines « readers » en cis-histone, quand le domaine catalytique agit sur la même histone ou en trans-histone, quand la marque lue par la protéine « reader » est sur une histone différente que la marque ajoutée ou éliminée par la protéine à activité catalytique.

**E** : Interaction entre les protéines « readers » et « writers »/« erasers » au sein d'un complexe multiprotéique (adaptée de Su and Denu, 2016).

PTMs : Modification post-traductionnelle des histones.



de la chromatine (Shogren-Knaak *et al.*, 2006). Aussi, les modifications post-traductionnelles des histones peuvent servir de plateformes pour le recrutement de complexes protéiques qui vont avoir la capacité de moduler la chromatine et de réguler l'expression des gènes. Les complexes protéiques vont être capables de reconnaître et de se lier aux modifications *via* des domaines dits « readers ». Ainsi, les marques H3K4me, H3S10p ou H3K14ac sont associées à une activation transcriptionnelle tandis que les marques H3K9me ou H3K27me sont associées à la répression transcriptionnelle (Bierne *et al.*, 2012). Les modifications des histones délimitent les éléments fonctionnels dans les génomes des mammifères. Notamment, les promoteurs actifs sont caractérisés par des marques d'acétylation, des di- ou triméthylations de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me<sub>2/3</sub>) et la présence du variant d'histone H2A.Z. Les régions transcrites sont enrichies en marques H3K36me<sub>3</sub> et H3K79me<sub>2</sub> tandis que les marques H3K9me<sub>2/3</sub> et H3K27me<sub>3</sub> sont localisées au niveau de gènes réprimés (Zhou *et al.*, 2011). Aussi, il existe un dialogue entre les modifications des histones (Bannister & Kouzarides, 2011). Par exemple, l'acétylation de H3K9 inhibe la méthylation sur le même résidu et favorise également la méthylation de H3K4 résultant en une chromatine permissive et en l'activation de la transcription (Fischle *et al.*, 2003).

Il est également important de prendre en compte que la diversité des modifications post-traductionnelles des histones créent des modèles de combinaison complexes où des modifications peuvent être sur la même protéine histone, sur des protéines histones différentes au sein d'un même nucléosome ou sur des protéines histones différentes issues de nucléosomes différents. Cette complexité peut être « lue » grâce à la coexistence des domaines « readers » dans les complexes protéiques, reconnaissant des marques similaires ou différentes (**Figure 9A**) (Z. Su & Denu, 2016). Aussi, la présence des protéines « readers » au sein de complexes protéiques permet de recruter des enzymes « writers » ou « erasers » suite à la reconnaissance des différentes marques, améliorant l'efficacité des enzymes (**Figure 9B-E**). Ainsi, il existe un dialogue entre les marques épigénétiques. Par exemple, la présence de la marque H3K4me<sub>3</sub> favorise l'acétylation des histones au niveau des promoteurs. En effet, la protéine Sgf29 appartenant au complexe SAGA présente un domaine Tudor qui va se fixer à la marque H3K4me<sub>3</sub>, recrutant le complexe SAGA et favorisant l'acétylation des histones H3 (Bian *et al.*, 2011).

#### d. Acétylation des histones

L'acétylation des résidus lysines des histones, associée à l'activation de la transcription, est catalysée par les lysines/histones acétyltransférases (KATs/HATs) qui utilisent l'acétyl-CoA, issu du métabolisme cellulaire, comme donneur de groupement acétyl. Il existe 2 classes principales de HATs. Les HATs de type B, comprenant KAT1 et HAT4, sont cytoplasmiques, elles modifient les histones libres dans le cytoplasme après leur synthèse avant qu'elles ne soient transportées dans le noyau et associées avec l'ADN nouvellement synthétisé. Les HATs de type A, quant à elles, acétylent des protéines histones mais également des protéines non-histones au niveau nucléaire telles que des facteurs de transcription (c-Myc, p53, NF-κB (« Nuclear factor-kappa B »)). L'acétylation de ces protéines non-



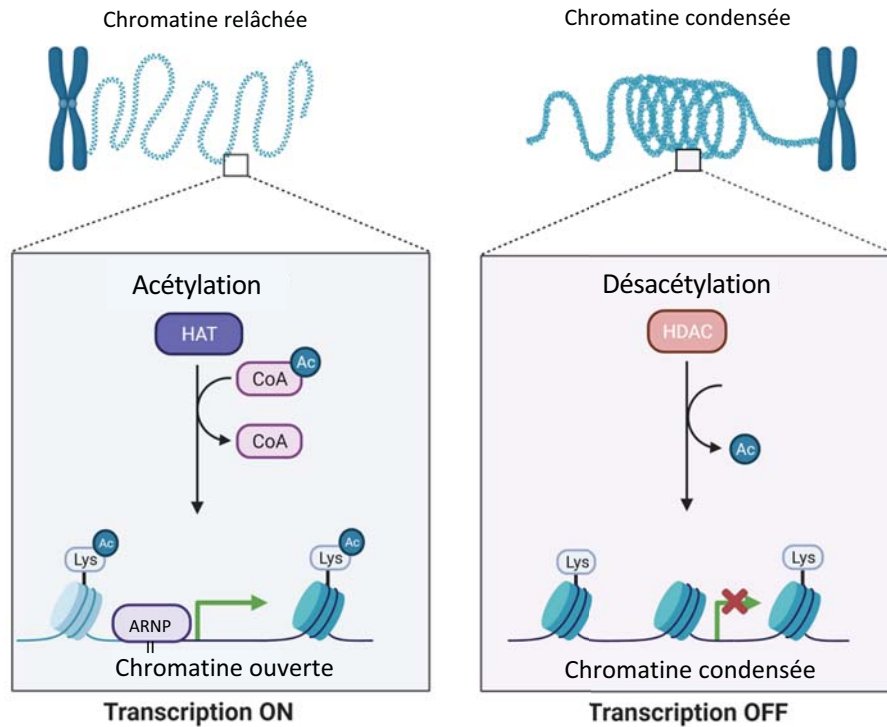
histones par les HATs de type A permet de réguler leur activité de facteur de transcription (Ghizzoni *et al.*, 2011; Grossman, 2001; Patel *et al.*, 2004). Les HATs de type A peuvent être séparées en 3 familles : la famille GNAT (« Gcn5-related N-acetyltransferases ») comprenant KAT2A (GCN5) et KAT2B (PCAF), la famille MYST qui est la famille la plus large avec KAT5, 6A, 6B, 7 et 8 et la famille P300/CBP comprenant KAT3A (CBP) et KAT3B (P300). Les co-activateurs transcriptionnels KAT4 et KAT12 tout comme les co-activateurs des récepteurs stéroïdiens KAT13A-D ont une activité acétyltransférase en plus de leur autre fonction (Wapenaar & Dekker, 2016).

Les HATs présentent des spécificités de substrat. KAT3A et KAT3B vont acétyler les 4 types d'histones tandis que KAT6A va seulement acétyler l'histone H3 et KAT8 la lysine 16 de l'histone H4 (Ogryzko *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2000; Y.-L. Wang *et al.*, 2008). Cette spécificité de substrat est modulée par l'incorporation des HATs dans de larges complexes protéiques tels que PCAF, STAGA, TFTC comprenant des HATs de la famille GNAT, ou TIP60, HBO1 et MOZ/MORF pour les HATs de la famille MYST (K. K. Lee & Workman, 2007).

### **e. « Readers » de l'acétylation des histones**

Le bromodomaine a été le premier module identifié comme capable de « lire » les marques d'acétylation au niveau des lysines (Dhalluin *et al.*, 1999). La capacité du bromodomaine à reconnaître les lysines acétylées est liée à la présence d'une poche hydrophobe (Sanchez & Zhou, 2009). Chez l'Homme, il existe 42 protéines possédant un bromodomaine parmi lesquelles on retrouve les HATs PCAF, GCN5 et P300/CBP. Ainsi, la présence de bromodomaine dans ces HATs contribuerait au recrutement et à la spécificité du substrat en se liant à des lysines acétylées favorisant par la suite l'acétylation d'autres résidus. On retrouve également des bromodomains dans certaines histones lysine méthyltransférases telles que ASH1L et MLL ainsi que dans des complexes de remodelage de la chromatine (SWI/SNF, ISWI, CHD, INO80) ou au niveau de régulateurs transcriptionnels. Aussi, la présence de 2 bromodomains a été observée dans des sous-unités du complexe d'initiation de la transcription ou dans les protéines BET importantes pour l'assemblage du complexe d'activation transcriptionnelle (Marmorstein & Zhou, 2014). Notamment, la protéine BET BRD4 se lie *via* ses bromodomains à la marque H4K5ac et accélère la synthèse d'ARNm en décompactant la chromatine facilitant ainsi la réactivation transcriptionnelle (R. Zhao *et al.*, 2011). Les bromodomains sont également souvent présents avec d'autres modules protéiques présentant différentes fonctions, le module le plus fréquemment associé avec le bromodomaine étant le domaine PHD.

D'autres domaines peuvent se lier aux lysines acétylées. Par exemple, les domaines PHD en tandem de DPF3b (composant d'un complexe de remodelage de la chromatine) peuvent interagir avec des résidus méthylés mais également acétylés, spécifiquement avec le résidu H3K14ac. De manière plus



**Figure 10 : La régulation de l'acétylation des histones influence l'activité transcriptionnelle des gènes.**

**A :** Les HATs apposent un groupement acétyl sur les résidus lysine menant à un relâchement de la chromatine favorable à la transcription.

**B :** Les HDACs sont les enzymes responsables de l'élimination des groupements acétyls, ce qui conduit à une condensation de la chromatine défavorable à l'expression des gènes (adaptée de Hai *et al.*, 2021).

Ac : groupement acétyl, ARNP : ARN polymérase II, CoA : coenzyme A, HAT : Histone acétyltransférase, HDAC : Histone désacétylase, Lys : lysine.

Classe	HDAC	Structure du domaine	Localisation cellulaire
I	HDAC1		Noyau
	HDAC2		Noyau
	HDAC3		Noyau /Cytoplasme
	HDAC8		Noyau
II	HDAC4		Noyau /Cytoplasme
	HDAC5		Noyau /Cytoplasme
	HDAC7		Noyau /Cytoplasme
	HDAC9		Noyau /Cytoplasme
IIb	HDAC6		Noyau /Cytoplasme
	HDAC10		Noyau /Cytoplasme
IV	HDAC11		Noyau
III	SIRT1		Noyau /Cytoplasme
	SIRT2		Cytoplasme
	SIRT3		Noyau /Mitochondrie
	SIRT4		Mitochondrie
	SIRT5		Mitochondrie
	SIRT6		Noyau /Cytoplasme
	SIRT7		Noyau

**Figure 11 : Classification et structure des domaines des HDACs** (adaptée de Kwon *et al.*, 2020).

HDAC : Histone désacétylase, SIRT : Sirtuine, MEF2 : Myocyte Enhancer Factor 2.

précise, le premier domaine PHD se lie à H3K14ac tandis que le second domaine PHD se lie aux résidus non modifiés H3R2-K4 (Qiu *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2010).

Le domaine YEATS est aussi capable d'interagir avec des résidus lysines acétylés. Chez l'Homme, 4 protéines contenant un domaine YEATS ont été identifiées, associées avec des HATs, des complexes de remodelage de la chromatine ou des complexes de régulation de la transcription (Schulze *et al.*, 2009). Par exemple, les protéines AF9 et ENL, qui appartiennent au super complexe d'élongation (SEC), reconnaissent et se lient spécifiquement à la marque H3K9ac ce qui permet le recrutement de SEC et de l'histone méthyltransférase DOT1L (Gates *et al.*, 2017; Y. Li *et al.*, 2014).

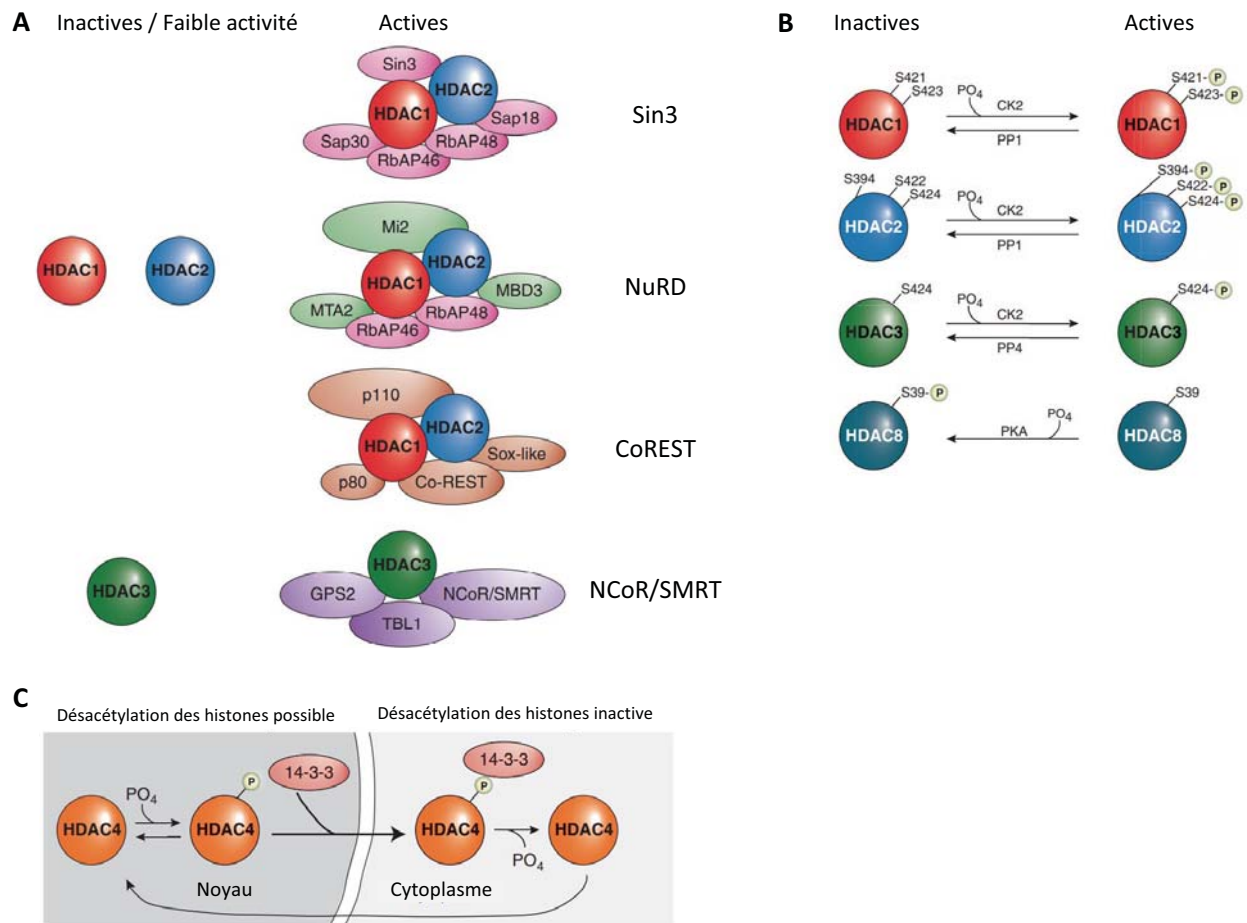
## **f. Désacétylation des histones**

### **i. Les différentes classes de HDACs**

Ce sont les histones désacétylases (HDACs) qui sont responsables de l'élimination des groupements acétyles, ce qui entraîne une condensation de la chromatine défavorable à la transcription (**Figure 10**). Chez l'Homme et la souris, il existe 18 HDACs, identifiées sur la base d'analyses phylogénétiques et d'homologie de séquence avec des protéines de levure (S.-Y. Park & Kim, 2020; Seto & Yoshida, 2014). Les HDACs sont regroupées dans 4 classes distinctes (classe I à IV). Les HDACs des classes I, II et IV appartiennent à la famille des histones désacétylases classiques et ont une activité enzymatique dépendante du zinc tandis que les HDACs de classe III appartiennent à la famille Sir2 régulateur et présentent une dépendance enzymatique vis-à-vis du cofacteur NAD<sup>+</sup>. La classe I est composée de HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC8, ces HDACs étant essentiellement localisées au niveau nucléaire. La classe II est composée de 6 protéines divisées en 2 sous-classes : HDAC4, HDAC5, HDAC7 et HDAC9 forment la sous-classe IIa tandis que HDAC6 et HDAC10, caractérisées par une longue extrémité C-terminale, forment la sous-classe IIb. On retrouve les HDACs de classe II à la fois dans le noyau et le cytosol. HDAC11 est la seule représentante de la classe IV. La classe III correspond aux sirtuines (SIRT), elle comprend 7 membres (SIRT1 à SIRT7) qui peuvent être localisées au niveau du noyau, du cytoplasme ou des mitochondries (**Figure 11**). Nous nous concentrerons uniquement sur les HDACs classiques et non les sirtuines pour le reste de l'étude bibliographique.

### **ii. Les substrats des HDACs**

La recherche de la spécificité de substrat des HDACs a été compliquée due à la redondance fonctionnelle des HDACs ainsi que leur présence au sein de complexes protéiques divers. En effet, des résultats contradictoires ont été obtenus lors de la recherche des substrats spécifiques de HDAC3 par exemple. Dans certaines études, HDAC3 désacétyle l'histone H4 plus efficacement que HDAC1 alors que dans d'autres études, le « silencing » de HDAC3 n'a pas d'impact sur le niveau d'acétylation de H3 ou H4 (C. A. Johnson *et al.*, 2002; X. Zhang *et al.*, 2004). D'autres travaux ont montré que HDAC1 pouvait désacétyler les 4 histones du core du nucléosome avec des efficacités différentes tandis que



**Figure 12 : Exemples de la régulation de l'activité des HDACs.**

**A : Régulation de l'activité enzymatique des HDACs via la formation de complexes protéiques.** L'activité enzymatique de HDAC1, HDAC2 et HDAC3 est faible lorsqu'elles sont seules, tandis qu'elle augmente significativement lorsqu'elles sont présentes au sein de complexes protéiques.

**B : Régulation de l'activité enzymatique des HDACs via des modifications post-traductionnelles.** De manière générale, la phosphorylation de résidus sérines active HDAC1, HDAC2 et HDAC3 mais réprime l'activité de HDAC8.

**C : Exemple de phosphorylation des HDACs de classe IIa.** La phosphorylation de HDAC4 entraîne sa liaison avec la protéine 14-3-3 ce qui mène à son export du noyau vers le cytoplasme (adaptée de Seto and Yoshida, 2014).

HDAC8 désacétyle préférentiellement les histones H3 et H4 et HDAC11 désacétyle spécifiquement H3K9 et H3K14 (Hu *et al.*, 2000; C. A. Johnson *et al.*, 2002). Les HDACs sont également capables de désacétyle des protéines non histones (Seto & Yoshida, 2014; Toro & Watt, 2020). C'est notamment le cas de HDAC6, qui est connu pour majoritairement désacétyle des protéines non histones. Le substrat principal de HDAC6 est la tubuline, le niveau d'acétylation de la tubuline contribuant à la stabilité mécanique des microtubules à longue durée de vie dans la cellule (Hubbert *et al.*, 2002; Matsuyama *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2017; Y. Zhang *et al.*, 2003). Un autre substrat bien caractérisé de HDAC6 est la protéine de choc thermique 90 (HSP90) dont la fonction chaperonne est inhibée par l'acétylation d'une de ses lysines (Bali *et al.*, 2005; Kovacs *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2005). Les HDACs de classe I peuvent également désacétyle des protéines non histones. À titre d'exemple, ces HDACs peuvent désacétyle l'activateur transcriptionnel SNF2L, la kinase ABL1, la facteur de transcription WSTF ou encore la protéine de groupe à haute mobilité HMGA1 (T. Li *et al.*, 2014). De manière plus spécifique, HDAC1, HDAC3 et SIRT1 sont capables de désacétyle la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B ce qui module son activité transcriptionnelle (B. Huang *et al.*, 2010). La protéine suppresseur de tumeur p53 peut être désacétylée par HDAC1, favorisant ainsi son ubiquitination et sa dégradation, mais aussi par SIRT1 ce qui bloque son activité transcriptionnelle (Luo *et al.*, 2000; Vaziri *et al.*, 2001). En effet, il a été démontré que l'acétylation inhibait l'ubiquitination des protéines et la dégradation protéosomale qui en découle (Caron *et al.*, 2005).

### iii. Complexes protéiques impliquant les HDACs

L'activité enzymatique des HDACs est fortement régulée, notamment *via* des interactions avec d'autres protéines ou des modifications post-traductionnelles. L'activité enzymatique des HDACs de classe I est plus importante lorsque celles-ci interagissent avec d'autres acteurs au sein de complexes multiprotéiques que lorsqu'elles sont seules. Notamment, HDAC1 et HDAC2 font, ensemble, partis de plusieurs complexes multiprotéiques : les complexes répresseurs CoREST, Sin3, NuRD sont les plus connus (**Figure 12A**) (K. Lee *et al.*, 2022). Le complexe CoREST est unique parmi les complexes impliquant des HDACs de classe I car il présente à la fois une activité HDAC avec HDAC1 et HDAC2 et une activité histone déméthylase avec LSD1, la protéine CoREST1 permettant de maintenir le lien entre ces enzymes. Ce complexe va éliminer les modifications post-traductionnelles associées à une transcription active au niveau des promoteurs et « enhancers » des gènes suite à son recrutement par des facteurs de transcription tels que REST. Sin3 et NuRD ont un core commun composé de HDAC1, HDAC2, RbAp46 et RbAp48. Le complexe NuRD possède une activité de remodelage de la chromatine en plus de son activité désacétylase. Le complexe SMRT/NCoR est le seul complexe contenant HDAC3 et l'interaction entre HDAC3 et SMRT/NCoR stimule l'activité de HDAC3 (Wen *et al.*, 2000). Pour les complexes NuRD et SMRT/NCoR, il a été démontré que les domaines SANT des protéines co-répresseurs MTA1 (NuRD) et SMRT/NCoR jouaient un rôle clé dans l'activation de l'activité HDAC

en médiant l'interaction avec des phosphates inositols, essentiels pour une activité désacétylase totale (Millard *et al.*, 2013; Watson *et al.*, 2012). De plus, ces complexes présentent des spécificités de substrat : le complexe Sin3 est capable de désacétyler H3 et H4 tandis que le complexe SMRT/NCOR désacétyle préférentiellement H3 (Vermeulen *et al.*, 2004). Il est à noter que HDAC8, dernier membre des HDACs de classe I, agit seul, sans former de large complexes protéiques (Hu *et al.*, 2000). Les HDACs de classe IIa présentent une activité enzymatique très faible par rapport aux HDACs de classe I qui serait due à une substitution d'une tyrosine par une histidine au niveau du site catalytique, le résidu tyrosine étant conservé chez les HDACs de classe I. En effet, une étude a montré qu'un mutant de HDAC4 présentant un résidu tyrosine à la place de l'histidine présentait une activité enzymatique 1000 fois plus élevée que la protéine sauvage (Lahm *et al.*, 2007). Les données actuellement disponibles suggèrent que les HDACs de classe IIa réguleraient l'acétylation des histones et l'expression des gènes *via* leur interaction avec des facteurs de transcription ou avec le complexe de répression transcriptionnelle SMRT/NCOR/HDAC3 en jouant le rôle de protéine d'échafaudage pour le complexe (Clocchiatti *et al.*, 2011; Fischle *et al.*, 2002; Hudson *et al.*, 2015). Il est aussi suggéré que ces HDACs de classe IIa auraient un rôle de protéine « reader » comme les protéines à bromodomaine. Pour appuyer cette hypothèse, Zhang et collaborateurs ont récemment démontré que HDAC7 était capable de reconnaître des résidus acétylés, notamment sur le récepteur des androgènes, menant à la dissociation du complexe qu'il formait avec SMRT/NCOR (Y. Zhang *et al.*, 2022).

#### **iv. Modifications post-traductionnelles des HDACs**

Les HDACs peuvent subir des modifications post-traductionnelles telles que des acétylations, glycosylations, sumoylations, ubiquitinations ou phosphorylations (Segré & Chiocca, 2011; Seto & Yoshida, 2014). La phosphorylation, qui est la modification la plus étudiée, affecte la fonctionnalité des HDACs. HDAC1 est phosphorylée par la protéine kinase CK2 au niveau des résidus sérines 421 et 423 et ces phosphorylations sont essentielles pour l'activité enzymatique de HDAC1. En effet, des mutations au niveau de ces résidus diminuent l'activité enzymatique et perturbent la formation des complexes protéiques dans lesquels HDAC1 est impliquée (Pflum *et al.*, 2001). D'une manière similaire, HDAC2 est phosphorylée sur ses résidus sérines 394, 422 et 424 favorisant également son activité enzymatique et la formation des complexes protéiques (Tsai & Seto, 2002). C'est la protéine phosphatase 1 (PP1) qui est responsable de l'élimination des phosphorylations sur HDAC1 et HDAC2 (Galasinski *et al.*, 2002). Quant à HDAC3, elle est phosphorylée par CK2 et l'ADN-PK ce qui augmente son activité enzymatique, elle peut aussi être phosphorylée par GSK-3 $\beta$  (Bardai & D'Mello, 2011; X. Zhang *et al.*, 2005). Le site accepteur de la phosphorylation est la sérine 424 et sa mutation impacte négativement l'activité enzymatique de HDAC3 comme observé précédemment avec HDAC1 et HDAC2. HDAC3 est déphosphorylée par le complexe sérine/thréonine phosphatase 4 (PP4), ce qui inhibe son activité enzymatique (X. Zhang *et al.*, 2005). La régulation de HDAC8 est différente des autres HDACs de



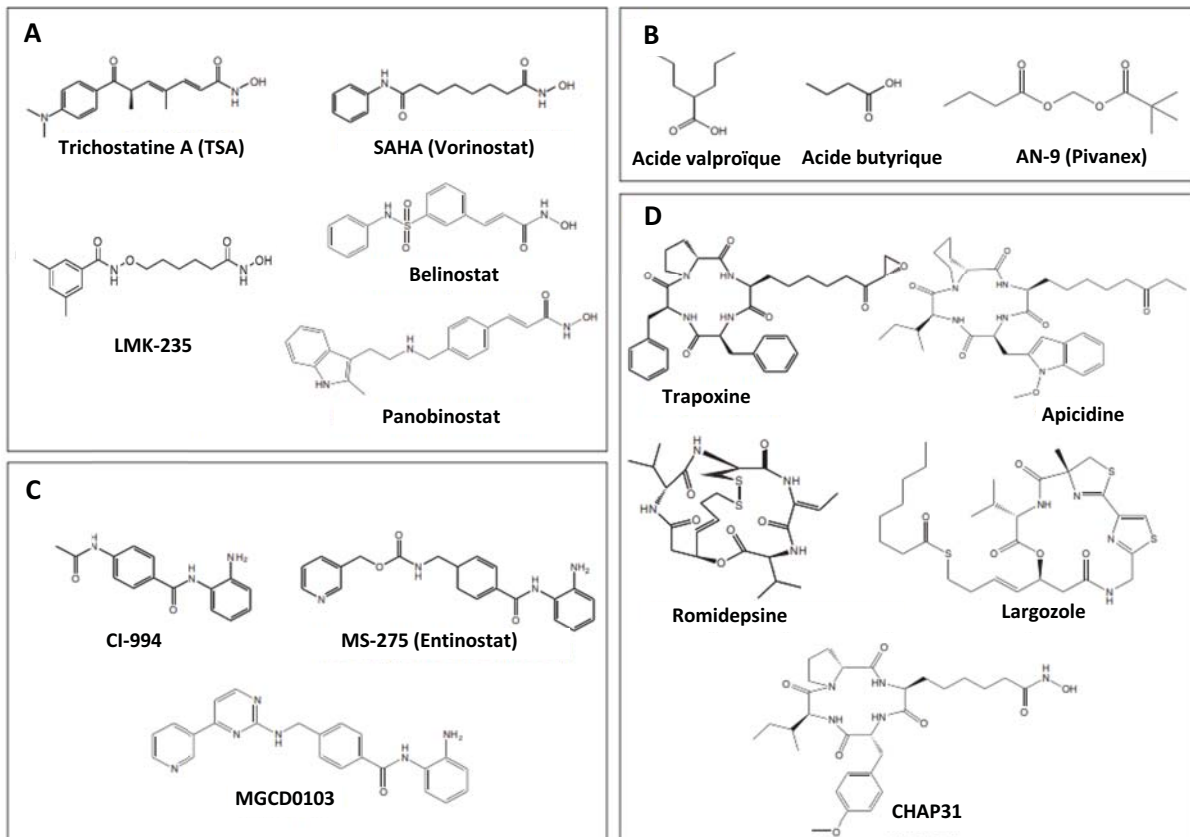
classe I. En effet, pour HDAC8, la phosphorylation de son résidu sérine 39 par la protéine kinase CK2 inhibe son activité enzymatique, tandis qu'une mutation de ce résidu pour une alanine augmente l'activité enzymatique (**Figure 12B**) (H. Lee *et al.*, 2004).

Concernant les HDACs de classe IIa, la phosphorylation régule leur localisation cellulaire ce qui impacte leur association avec les complexes protéiques. En effet, la phosphorylation des sites flanquant la région NLS (« Nuclear Localization Sequence ») chez les HDACs de classe IIa favorise la fixation de la protéine chaperonne 14-3-3 entraînant l'export nucléaire médié par la protéine CRM1 et inhibant ainsi la capacité des HDACs à jouer leur rôle de répresseur transcriptionnel (**Figure 12C**) (Mathias *et al.*, 2015; Seto & Yang, 2010). Notamment, la liaison des protéines 14-3-3 à HDAC4 limite son interaction avec l'importine menant à la séquestration cytoplasmique de HDAC4. Aussi, la déphosphorylation de HDAC4 et HDAC5 leur permet de transloquer dans le noyau, d'interagir avec HDAC3 et de réprimer l'expression des gènes (Grozinger & Schreiber, 2000). Six groupes de kinases phosphorylent le site de fixation des protéines 14-3-3 tandis que les protéines phosphatases 1 et 2A sont responsables de la déphosphorylation des résidus. Aussi, la phosphorylation des HDACs de classe IIa mènerait à leur ubiquitination et leur dégradation protéosomale (Clocchiatti *et al.*, 2011; Seto & Yang, 2010). Pour finir, Aurora A (AurA) phosphoryle HDAC6 ce qui favorise son activité désacétylase vis-à-vis de la tubuline (Pugacheva *et al.*, 2007).

Ainsi, l'ensemble des données présentées dans cette partie montre la complexité de la régulation de l'expression des gènes par les modifications post-traductionnelles des histones. En effet, divers résidus peuvent être modifiés par différents groupements menant à des effets variés sur l'état de compaction de la chromatine. Il existe également une grande variété d'acteurs impliqués dans cette régulation des modifications post-traductionnelles des histones, que ce soit les protéines « readers » ou les enzymes responsables de l'apposition ou de l'élimination des groupements, qui elles aussi, peuvent subir des modifications post-traductionnelles impactant leur activité, comme c'est par exemple le cas avec les HDACs. Tous ces mécanismes conduisent à une régulation fine de l'expression des gènes. Cependant, il peut arriver qu'il y ait une dérégulation de ces mécanismes ce qui peut, dans certains cas, participer à l'apparition de certaines pathologies.

### III. Rôle des HDACs en condition physiologique et pathologique

Pour comprendre le rôle des HDACs en contexte physiologique ou pathologique, de nombreuses études se sont appuyées sur des modèles de souris KO (« Knock-out ») pour les HDACs. Ces modèles ont permis de révéler l'importance des HDACs lors du développement, de la prolifération et de la différenciation cellulaire dans différents organes. En effet, des souris KO pour HDAC1 présentent un phénotype embryonnaire létal et de graves défauts de prolifération cellulaire associés à un retard de



**Figure 13 : Exemples d'inhibiteurs de HDACs.**

Les 4 classes d'inhibiteurs de HDACs, catégorisées en fonction de leur structure chimique, sont représentées : les acides hydroxamiques (A), les acides gras à chaînes courtes (B), les benzamides (C) et les peptides cycliques (D) (adaptée de Seto and Yoshida, 2014).

croissance embryonnaire général. Les souris KO pour HDAC2 présentent de sérieux défauts cardiaques et meurent 24h après la naissance. Une mort embryonnaire due à des défauts de gastrulation est observée chez les souris KO pour HDAC3 tandis les souris KO pour HDAC8 sont viables mais présentent des défauts crânio-faciaux. Concernant les souris KO pour HDAC5 et HDAC9, elles sont viables mais présentent des défauts cardiaques. Les souris KO pour HDAC4 présentent une hypertrophie des chondrocytes et meurent d'une ossification excessive dans les 7 jours suivant la naissance tandis que le « knock-out » pour HDAC7 est létal au stade embryonnaire en raison de la perte de la vascularisation. Pour finir, les souris KO pour HDAC6 et HDAC11 sont viables et ne présentent pas de phénotype particulier excepté une augmentation de l'acétylation de la tubuline pour les souris KO pour HDAC6. Il n'y a pas d'information disponible concernant le « knock-out » des souris pour HDAC10 (H.-J. Kim & Bae, 2011). Ces observations montrent clairement le rôle central des HDACs dans les mécanismes de développement ainsi que dans le maintien de l'homéostasie générale. Afin d'étudier le rôle des HDACs *in vivo* et de palier au fait que des KO HDACs sont létaux, de nombreuses études ont eu recours soit à l'utilisation de KO conditionnels soit à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des HDACs pour identifier leurs rôles dans différents contextes.

## 1. Les inhibiteurs de HDACs (HDACi)

### a. Les différents types de HDACi

Les HDACi peuvent être divisés en 4 classes de composés basés sur leur structure chimique : les acides hydroxamiques, les acides gras à chaînes courtes, les benzamides et les tétrapeptides cycliques (**Figure 13**). La pharmacophore des HDACi est généralement constituée d'une fraction liant le zinc, d'une partie linker et d'un « capping group » qui interagit avec des acides aminés du site actif des HDACs (M. Jung *et al.*, 1997). Les HDACi peuvent être d'origine naturelle ou avoir été développés synthétiquement (Seto & Yoshida, 2014). La trichostatine A (TSA), un métabolite issu de *Streptomyces*, a été le premier inhibiteur de HDACs identifié il y a plus de 30 ans (Yoshida *et al.*, 1990). Comme la TSA, il existe d'autres HDACi d'origine naturelle comme la psammaline A ou l'azumamide, isolées d'une éponge marine, la spiruchostatine A issues de bactéries ou encore le largazole provenant de cyanobactéries et la trapoxine A issu d'un champignon (Ho *et al.*, 2020). Les acides gras à chaînes courtes (AGCC), issus de la fermentation des carbohydrates non digérés par les bactéries du microbiote intestinal, sont également des HDACi naturels (Deleu *et al.*, 2021). La classe de HDACi la plus étudiée est celle des acides hydroxamiques, dont fait partie le SAHA (« suberoylanilide hydroxamic acid »), l'inhibiteur synthétique de HDACs le plus connu. Ces inhibiteurs interagissent avec les HDACs en insérant leur chaîne aliphatique au niveau du site catalytique et chélatent le zinc nécessaire à l'activité enzymatique des HDACs *via* leurs groupements carbonyle et hydroxyle. Quant aux benzamides, ils se lient à l'ion zinc par l'intermédiaire des groupements carbonyle et amine pour former un complexe chélaté (Seto & Yoshida, 2014). Les peptides cycliques contiennent différents groupes de liaison au zinc

tels que les cétones et les thiols électrophiles. Par exemple, la romidepsine (ou FK228) présente un pont disulfure réduit au sein des cellules, produisant une chaîne latérale thiol qui se coordonne au zinc du site actif (Furumai *et al.*, 2002).

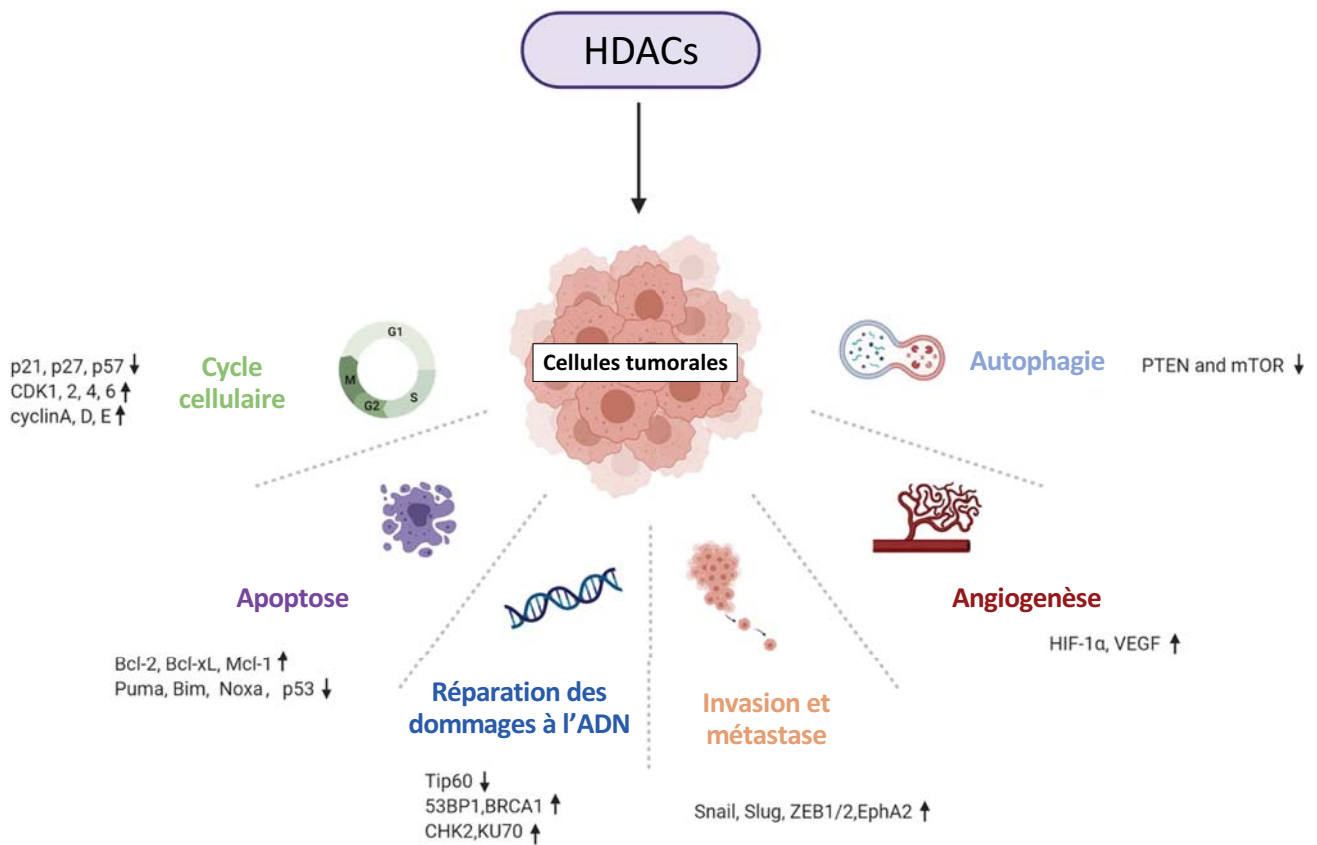
### **b. Spécificité des HDACi**

Les inhibiteurs de HDACs (HDACi) peuvent agir contre tous les types de HDACs (pan-HDACi) certaines classes de HDACs ou contre des HDACs spécifiques. Par exemple, la TSA et le SAHA sont des pan-HDACi qui bloquent les HDACs de classe I, II et IV. Toutefois, la sensibilité vis-à-vis de ces inhibiteurs est variable selon les HDACs, avec certaines activités HDACs inhibées uniquement au-dessus des concentrations pharmacologiquement pertinentes (Bradner *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2020). De manière différente, le MS-275 et les benzamides en général inhibent préférentiellement les HDACs de classe I à l'exception de HDAC8. La tubacine a été le premier HDACi sélectif identifié, inhibant spécifiquement HDAC6 et la désacétylation de l' $\alpha$ -tubuline (Haggarty *et al.*, 2003). De nouveaux inhibiteurs de HDACs sont régulièrement synthétisés pour bloquer les HDACs de manière plus spécifique et efficace.

## **2. Rôles des HDACs dans les processus cancéreux**

De nombreuses études se sont intéressées aux rôles des HDACs dans les cancers, ce qui a permis d'identifier un grand nombre de leurs fonctions. Une expression aberrante des HDACs classiques (classe I, II, IV) a été observée dans une variété de tumeurs malignes, qu'elles soient solides ou hématologiques. Dans la plupart des cas, un fort niveau d'expression des HDACs est associé à une maladie à un stade avancé avec des patients présentant un mauvais pronostic (Eckschlager *et al.*, 2017; Y. Li & Seto, 2016). Par exemple, *HDAC1* est fortement exprimée dans les cancers gastriques, des poumons, de l'œsophage, du côlon, du sein ou de la prostate (Choi *et al.*, 2001; Minamiya *et al.*, 2011; Weichert, Röske, Gekeler, Beckers, Stephan, *et al.*, 2008; Weichert, Röske, Niesporek, *et al.*, 2008; Z. Zhang *et al.*, 2005). Une forte expression des *HDAC1*, *HDAC2* et *HDAC3* constitue un facteur de mauvais pronostic dans les cas de cancers gastriques et ovariens (Sudo *et al.*, 2011; Weichert, Denkert, Noske, *et al.*, 2008; Weichert, Röske, Gekeler, Beckers, Ebert, *et al.*, 2008). Aussi, dans le myélome multiple, il a été observé une dérégulation de l'expression des HDACs, la surexpression des HDACs de classe I, surtout *HDAC1*, étant associée à un mauvais pronostic (Mithraprabhu *et al.*, 2014). En plus de la dérégulation de leur expression, les HDACs, au sein de leurs complexes protéiques répresseurs, peuvent être recrutées de manière aberrante au niveau de gènes cibles par des protéines oncogènes pour réprimer l'expression de gènes spécifiques et activer la tumorigénèse (Hug & Lazar, 2004).

Les HDACs jouent des rôles importants dans le cancer en désacétylant des protéines histones et non histones qui sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la réponse aux dommages à l'ADN, la formation des métastases, l'angiogénèse ou encore l'autophagie, ce qui explique



**Figure 14 : Voies impliquées dans la tumorigenèse et régulées par les HDACs.**

Représentation de processus tumorigènes impliquant les HDACs tels que la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation des dommages à l'ADN, le processus métastatique, l'angiogenèse ou l'autophagie (adaptée de Hai *et al.*, 2021).

l'utilisation des HDACi dans le traitement de certains cancers (**Figure 14**) (Eckschlager *et al.*, 2017; Hai *et al.*, 2021; Y. Li & Seto, 2016). Quelques exemples de l'implication des HDACs dans les différents processus sont présentés ci-dessous.

### **a. HDACs dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose**

Il a été démontré que l'inhibition des HDACs avait un effet antiprolifératif notamment en induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 *via* l'augmentation de l'expression de gènes du cycle cellulaire tels que l'inhibiteur de CDK (« cyclin-dependent kinases ») p21, connu pour entraîner un arrêt du cycle cellulaire. Notamment, HDAC1 et HDAC2 se lient aux promoteurs des gènes p21 et p57 ce qui inhibe leur expression *via* le remodelage de la chromatine. La perte de HDAC1 ou HDAC2 induit l'expression de ces inhibiteurs de CDK, p21 et p57, bloquant la formation de dimère entre cyclines et CDK et menant à un blocage du cycle cellulaire en phase G1 (Yamaguchi *et al.*, 2010; Zupkovitz *et al.*, 2010). Il a aussi été montré que le « knock-down » de HDAC5 menait à une augmentation de l'expression de p21 et à une inhibition de la cycline D1 et des CDK2/4/6 conduisant à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 dans cellules issues d'un carcinome hépatocellulaire (Fan *et al.*, 2014). L'expression de p21 est également régulée par la protéine suppresseur de tumeurs p53 qui interagit avec le promoteur de p21 pour activer son expression. L'inhibition des HDACs augmente l'acétylation de p53 ce qui accroît sa stabilité et améliore son interaction avec le promoteur de p21 (Bao *et al.*, 2016; Y. Zhao *et al.*, 2006). En plus de contrôler la transition G1/S, le « silencing » de HDAC1 dans des cellules tumorales bloque la transition G2/M et inhibe la croissance des cellules comme en témoigne la réduction du nombre de cellules en mitose et le plus grand nombre de cellules en apoptose (Senese *et al.*, 2007).

Les HDACi peuvent induire l'apoptose *via* l'augmentation de l'expression des récepteurs et des ligands de mort à la surface cellulaire, comme FAS et FAS-L (J. Zhang & Zhong, 2014). Les HDACi peuvent également activer l'apoptose en augmentant l'expression de protéines pro-apoptotiques et en diminuant l'expression de protéines anti-apoptotiques. En effet, il a été démontré que la perte de HDAC2 dans des cellules cancéreuses pulmonaires humaines résultait en une régression de la taille de la tumeur et entraînait le déclenchement de l'apoptose *via* l'activation de p53 et Bax (pro-apoptose) et la suppression de Bcl2 (anti-apoptose) (K. H. Jung *et al.*, 2012). Il a aussi été montré que le « knock-down » de HDAC2 dans des cellules gastriques induisait l'expression des facteurs pro-apoptotiques Bax, AIF et Apaf-1 et réprimait l'expression de Bcl-2 (J. K. Kim *et al.*, 2013). Les cellules cancéreuses sont plus sensibles à l'apoptose induites par les HDACi que les cellules normales, offrant un potentiel thérapeutique aux HDACi (Ungerstedt *et al.*, 2005).

### **b. HDACs dans les mécanismes de réparation de l'ADN**

Les HDACs ont également un rôle important dans le contrôle des mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN. HDAC1 et HDAC2 sont recrutés au niveau des sites de dommages à l'ADN pour



désacétyler les résidus H3K56 et H4K16 et faciliter la réparation par NHEJ (« Non-Homologous End-Joining »), suggérant un rôle direct de ces enzymes durant la réplication et la réparation des cassures double-brin (Miller *et al.*, 2010). Les HDACs régulent aussi d'autres protéines impliquées dans la réponse des dommages à l'ADN et l'inhibition des HDACs peut inhiber la réparation des cassures double brin et rendre les cellules cancéreuses plus sensibles aux radiations ionisantes et aux agents endommageant l'ADN (Koprinarova *et al.*, 2011).

### **c. HDACs dans le contrôle de la transition épithélio-mésenchymateuse et de l'angiogenèse**

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), caractérisée par la perte de marqueurs de cellules épithéliales comme *CDHI*, est un processus important dans l'invasion des cellules cancéreuses et la formation de métastases dans lequel les HDACs sont impliquées. Le répresseur transcriptionnel Snail va recruter HDAC1 et HDAC2 au niveau du promoteur de *CDHI* menant à la répression de son expression favorisant le processus métastatique (von Burstin *et al.*, 2009). Aussi, l'inhibition des HDACs dans des cellules de cancer du sein triple négatif induit l'expression de *CDHI* et réprime la TEM et le processus métastatique (Rhodes *et al.*, 2014). Ces études indiquent le potentiel thérapeutique de l'inhibition des HDACs de classe I pour cibler la TEM et la formation des métastases dans les cancers.

Les HDACs jouent un rôle important dans l'angiogenèse en modulant une multitude de facteurs pro- et anti-angiogéniques (Y. Li & Seto, 2016). Par exemple, la croissance tumorale et la formation de métastases dépendent de l'angiogenèse qui est activée par un environnement hypoxique. La réponse cellulaire à l'hypoxie est régulée par HIF-1 $\alpha$ . HDAC1 et HDAC4 désacétylent directement HIF-1 $\alpha$  bloquant sa dégradation (Geng *et al.*, 2011; Yoo *et al.*, 2006). HDAC5, quant à elle, ne régule pas l'acétylation de HIF-1 $\alpha$  mais désacétyle les protéines chaperonnes associées à HIF-1 $\alpha$ , HSP70 et HSP90, ce qui facilite la maturation et la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ . L'inhibition de HDAC5 résulte en l'hyperacétylation de ces chaperonnes, en l'accumulation d'un complexe HIF-1 $\alpha$  immature et finalement en la dégradation de HIF-1 $\alpha$  (S. Chen *et al.*, 2015). Aussi, HDAC4, HDAC5 et HDAC7 augmentent l'activité transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$  en promouvant son interaction avec l'histone acétyltransférase P300 et, donc favorisent le processus d'angiogenèse (Kato *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2009).

### **d. Utilisation des HDACi en thérapie anti-cancéreuse**

Aux vues du rôle central des HDACs dans les différents processus de carcinogenèse, de nombreuses études se sont intéressées à l'utilisation des HDACi dans le traitement des cancers. En effet, leur ciblage permettrait de réguler les niveaux anormaux d'acétylation des protéines observés dans les cellules cancéreuses et de réactiver l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs afin de bloquer le cycle cellulaire, d'induire l'apoptose ou d'inhiber l'angiogenèse et le processus métastatiques. De

nombreux HDACi d'origine naturelle ou synthétique ont été développés et caractérisés et 4 d'entre eux ont même reçu l'approbation de la FDA (« Food and Drug Administration ») pour être utilisés comme traitement anti-cancéreux tandis que plus de 20 HDACi différents sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques (Y. Li & Seto, 2016). Le SAHA a été le premier HDACi à être approuvé en 2006 pour le traitement du lymphome cutané à cellules T, puis ce fut la romidepsine en 2009 et le belinostat en 2014, toujours pour le traitement du lymphome cutané à cellules T. Le panobinostat a, quant à lui, été approuvé en 2015 pour le traitement du myélome multiple récidivant ou réfractaire. De nombreux autres HDACi sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques comme le MS-275, le givinostat ou le tucidinostat, ce dernier ayant déjà été approuvé par les autorités de santé chinoises pour le traitement du lymphome périphérique à cellules T (Gatla *et al.*, 2019; Ho *et al.*, 2020). Enfin, les effets bénéfiques d'autres inhibiteurs de HDACs, plus ou moins sélectifs, ont été démontrés dans différents modèles de cancer (Y. Li & Seto, 2016).

Toutefois, il a également été démontré que les HDACi pouvaient favoriser la migration de cellules cancéreuses provenant du foie, du côlon, des poumons ou de l'œsophage suggérant le besoin de développer des thérapies combinées pour limiter cet effet délétère lors de l'utilisation de HDACi (Ji *et al.*, 2015; K.-T. Lin *et al.*, 2012; D. Liu *et al.*, 2021; J. Wang, Xu, *et al.*, 2018). Aussi, les HDACi peuvent être utilisés avec d'autres agents anticancéreux pour optimiser leur efficacité et contrer les résistances à ces traitements. Notamment, la combinaison de la cisplatine avec le panobinostat permet de surmonter la résistance induite par l'hypoxie à la cisplatine en augmentant l'acétylation et la déstabilisation de HIF-1 $\alpha$  (Fischer *et al.*, 2015).

Les effets bénéfiques des HDACi sur les cancers suggèrent un rôle oncogénique des HDACs. Cependant, certaines études ont révélé qu'une faible expression de HDAC10 était associée avec un mauvais pronostic chez les patients souffrant de cancer du poumon ou de l'estomac (Jin *et al.*, 2014; Osada *et al.*, 2004). De plus, il a été montré que, dans le contexte d'une leucémie aiguë promyélocytaire, HDAC1 pouvait jouer un rôle oncosuppresseur durant la tumorigenèse et oncogène une fois les tumeurs établies (Santoro *et al.*, 2013). Cela suggère que la compréhension du rôle des HDACs à différentes étapes de la tumorigenèse dans divers types cellulaires est importante pour utiliser au mieux les HDACi dans le traitement des cancers.

L'ensemble de ces travaux sur le cancer ainsi que l'utilisation de HDACi a permis de mettre en lumière des fonctions très variées des différentes HDACs que ce soit dans le contrôle du cycle cellulaire, la régulation de l'apoptose, la TEM, la réparation de l'ADN ou encore l'angiogenèse. Cependant, d'autres études non centrées sur les mécanismes oncologiques ont permis de révéler que les HDACs jouaient aussi des rôles importants dans le maintien de l'homéostasie de nombreux organes.

### 3. Rôles des HDACs au niveau du système nerveux central

De nombreuses études se sont intéressées au rôle des HDACs dans le système nerveux central. En effet, il a été montré que les HDACs sont impliquées dans le développement du cerveau, l'apprentissage et la mémoire (Volmar & Wahlestedt, 2015). Notamment, la présence d'un seul allèle de *HDAC2* en absence de *HDAC1* est suffisante pour un développement normal du cerveau murin alors qu'un seul allèle de *HDAC1* en l'absence de *HDAC2* ne l'est pas, démontrant le rôle crucial de HDAC2 dans le développement cérébral (Hagelkruys *et al.*, 2014). Suite à ces observations, de nombreuses études utilisant des inhibiteurs de HDACs ont permis de révéler des fonctions essentielles des HDACs au niveau central.

Les HDACs sont également impliquées dans la neuroprotection, la différenciation neuronale ou encore la neurorégénération (Shukla & Tekwani, 2020). En effet, il a récemment été démontré que l'inhibition des HDACs de classe I augmentait l'expression de facteurs neurotrophiques et favorisait la recâblage neuronale et la récupération fonctionnelle après un traumatisme crânien traumatique chez la souris (Sada *et al.*, 2020). Cet effet bénéfique serait particulièrement dû à l'inhibition de HDAC2 puisque les auteurs ont montré que l'expression de *HDAC2* était augmentée tandis que celle de *BDNF* (codant pour une neurotrophine) était diminuée dans la moelle épinière des souris suite à un traumatisme crânien et que le « silencing » de HDAC2 entraînait une augmentation de l'acétylation au niveau du promoteur du *BDNF*, menant à une hausse de son expression.

Le potentiel thérapeutique des HDACi a aussi été démontré dans des modèles précliniques de sclérose en plaques (SP). En effet, la TSA, l'acide valproïque ou encore le SAHA améliorent l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle murin de SP (Ge *et al.*, 2013; Lillico *et al.*, 2018; Pazhoohan *et al.*, 2014; Z. Zhang *et al.*, 2012). Plus récemment, Sun et collaborateurs ont montré l'implication spécifique de HDAC11 dans la SP. En effet, l'absence de HDAC11 dans un modèle de EAE réduisait la démyélinisation de la moelle épinière et diminuait la sévérité clinique de la pathologie (L. Sun *et al.*, 2018). Plus spécifiquement, ils ont révélé que HDAC11 contribuait à la neuro-inflammation *via* la stimulation de l'expression de la chémokine *CCL2* en favorisant la fixation du facteur de transcription PU.1 au niveau de son promoteur. Ainsi, la perte de HDAC11 réduisait la sécrétion de *CCL2* et l'infiltration de cellules immunitaires au niveau du système nerveux central aboutissant au soulagement des symptômes.

Depuis quelques années, les intérêts thérapeutiques des HDACi se sont étendus aux affections touchant le système nerveux comme l'épilepsie ou les maladies neurodégénératives telles que la maladie de Huntington, la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (Romoli *et al.*, 2019; Shukla & Tekwani, 2020; Ziemka-Nalecz *et al.*, 2018). Dans les maladies neurodégénératives, une altération de l'homéostasie de l'acétylation des histones a notamment été observée, avec un basculement vers

l'hypoacétylation, majoritairement due à une perte de HATs (Saha & Pahan, 2006). Ainsi, les HDACi sont apparus comme des cibles thérapeutiques attractives. Concernant la maladie de Huntington (HD), il a été montré *in vivo* que des HDACi tels que le SAHA, le butyrate de sodium, la TSA ou le valproate avaient des effets bénéfiques dans des modèles de HD, en améliorant par exemple la déficience motrice et en réduisant les troubles cognitifs *via* l'augmentation de la mémoire de reconnaissance (Giralt *et al.*, 2012; Hecklau *et al.*, 2021; S. Sharma & Taliyan, 2015; Shukla & Tekwani, 2020).

Des études ont également montré que les HDACi pouvaient avoir un rôle bénéfique dans le traitement des désordres psychiatriques (Chakravarty *et al.*, 2014). Dans différents modèles murins de schizophrénie, l'administration d'acide valproïque ou de MS-275 augmentait l'expression de gènes normalement réprimés chez les patients et impliqués dans la schizophrénie (reeline, GAD67) ou améliorait les phénotypes associés à la schizophrénie (Bahari-Javan *et al.*, 2017; Tremolizzo *et al.*, 2002; van Enkhuizen *et al.*, 2013). Des effets bénéfiques des HDACi ont également été rapportés dans différents modèles murins de dépression, le traitement de souris avec butyrate de sodium, du SAHA ou du MS-275 résultant en des effets antidépresseurs avec une amélioration de l'anxiété, une restauration de l'humeur ou des interactions sociales des animaux (Chakravarty *et al.*, 2014; Covington *et al.*, 2009; Misztak *et al.*, 2018; F. A. Schroeder *et al.*, 2007). Concernant l'addiction, l'administration de TSA ou de MS-275 chez des rats entraînait une diminution de l'auto-administration de cocaïne ou d'alcool, réduisait le comportement de recherche de la drogue/alcool et diminuait également l'anxiété associée au sevrage (Host *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2008; Romieu *et al.*, 2008, 2011; Warnault *et al.*, 2013).

Ainsi, l'ensemble de ces études montrent que les HDACs jouent un rôle important au niveau central. Toutefois, les inhibiteurs de HDACs utilisés dans ces études précliniques ne sont pas spécifiques, d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents et le rôle des différentes HDACs dans ces désordres et pathologies afin de développer des HDACi plus spécifiques pour envisager un traitement chez l'Homme.

#### **4. Rôles des HDACs dans le maintien de l'homéostasie intestinale**

##### **a. HDACs et physiologie intestinale**

Plusieurs études ont permis de révéler le rôle crucial des HDACs dans l'homéostasie intestinale. Il a été démontré qu'*in vitro* et *in vivo*, l'inhibition des HDACs *via* le SAHA inhibait la croissance des cellules intestinales en culture et au niveau des cryptes intestinales de souris, et induisait un programme de différenciation précoce avec l'augmentation de l'expression de gènes spécifiquement exprimés par les entérocytes. De la même manière, il a été observé que le SAHA inhibait la prolifération de cryptes intestinales humaines (Roostae *et al.*, 2015). Ces résultats montrent que les HDACs favorisent la prolifération des cellules souches au niveau intestinal et contrôlent la différenciation cellulaire, deux fonctions centrales dans l'homéostasie intestinale.

De manière plus spécifique, il a été montré que HDAC1 et HDAC2 régulaient l'homéostasie des cellules souches intestinales, la perte de *Hdac1* et *Hdac2* chez des souris se traduisant par une perte des marqueurs des cellules souches et une perte de la capacité clonogénique des cryptes *ex vivo* (Zimmerlin *et al.*, 2015). De plus, il a été montré que des souris déficientes pour *Hdac1* et *Hdac2* spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales (CEIs) présentaient une altération de la croissance intestinale ainsi que des défauts au niveau de l'architecture intestinale avec des altérations de la différenciation cellulaire caractérisées par une réduction du nombre de cellules de Paneth et caliciformes (Turgeon *et al.*, 2013). L'ensemble des perturbations observées chez les mutants s'accompagne de l'activation des voies Notch, STAT3 et mTOR, l'inhibition de la voie JAK-STAT restaurant partiellement l'homéostasie intestinale chez les souris déficientes pour *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEIs (Gonneaud *et al.*, 2021). De plus, contrairement aux souris présentant un seul allèle de *Hdac1* mais aucun de *Hdac2*, les souris avec un seul allèle de *Hdac2* et aucun de *Hdac1* présentent des altérations de l'homéostasie intestinale similaires aux défauts observés chez les souris double KO pour *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEIs (Gonneaud *et al.*, 2016). Pour mieux comprendre les rôles de ces 2 HDACs, Gonneaud et collaborateurs ont établi des modèles d'organoïdes déficients pour *Hdac1* ou *Hdac2* et ils ont observé des altérations dans la différenciation des cellules de Paneth et caliciformes ainsi qu'une augmentation des précurseurs de cellules sécrétoires intermédiaires (Gonneaud *et al.*, 2019). Ils ont identifié des processus biologiques communs dépendants de l'expression de *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEIs, comme la réponse inflammatoire, l'oxydo-réduction et le processus métabolique des lipides, mais également des processus spécifiques à chaque délétion de HDAC démontrant que HDAC1 et HDAC2 pouvaient avoir des rôles complémentaires dans la régulation des CEIs.

D'autres travaux ont montré que les souris portant la délétion spécifique de HDAC3 dans les CEIs présentaient une importante perte du nombre et de la fonction des cellules de Paneth, une élongation des cryptes intestinales ainsi qu'une augmentation de la prolifération des CEIs (Alenghat *et al.*, 2013). Une susceptibilité augmentée aux dommages intestinaux et à l'inflammation induits par le DSS (« Dextran sulfate sodium ») a également été rapportée chez ces souris, indiquant que l'expression de HDAC3 dans les CEIs joue également un rôle important dans l'homéostasie intestinale. Une grande partie de ces effets étaient reversés lorsque les souris HDAC3<sup>ACEI</sup> étaient élevées en condition axénique suggérant que HDAC3 intègre des signaux provenant du microbiote pour maintenir l'homéostasie intestinale (Alenghat *et al.*, 2013). Il a également été démontré que HDAC3 jouait un rôle important dans l'oxydation des acides gras au niveau de l'épithélium intestinal (Dávalos-Salas *et al.*, 2019).

### **b. HDACs et fonction de barrière intestinale**

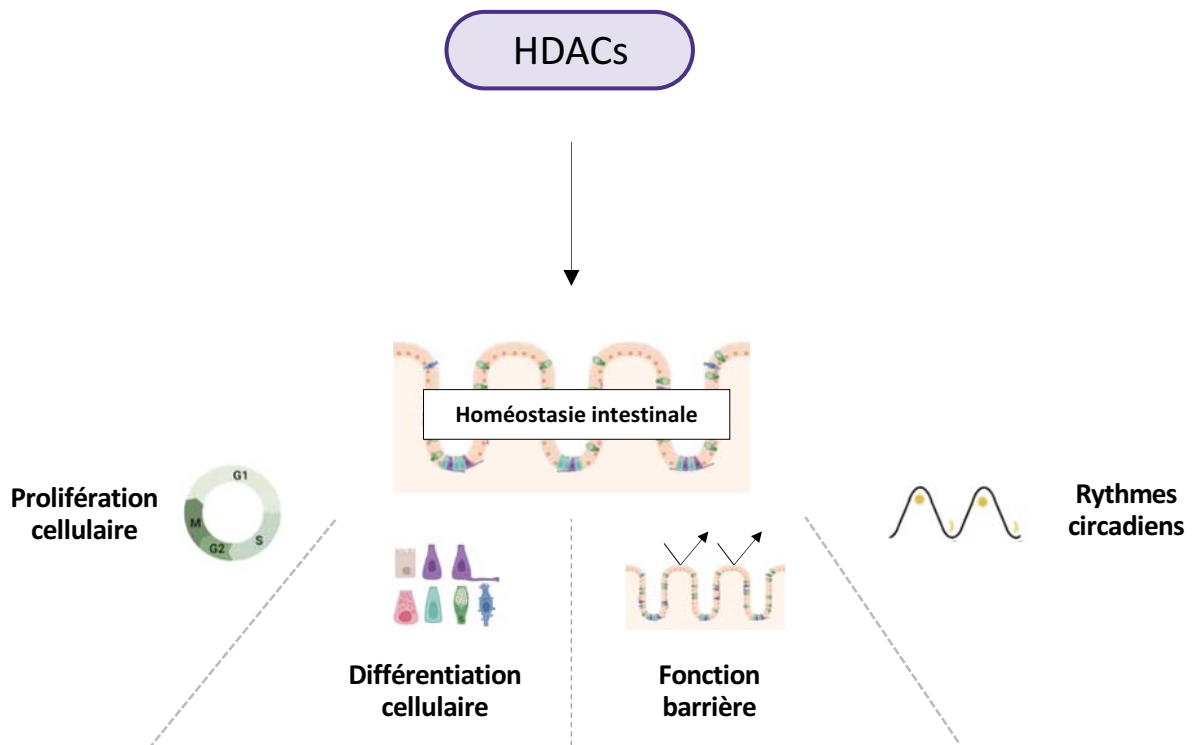
Les HDACs jouent un rôle clé dans la régulation de la fonction barrière de l'intestin. En effet, il a été montré *in vitro* que le butyrate de sodium (inhibiteur de HDACs) améliorait la fonction barrière *via* l'augmentation de l'expression de la claudine-1, en facilitant l'interaction du facteur de transcription

SP-1 avec le promoteur de ce gène (H.-B. Wang *et al.*, 2012). De plus, Friedrich et collaborateurs ont récemment montré que le traitement de cellules en culture avec des pan-HDACi protégeait l'intégrité de la barrière épithéliale de perturbation induite par le TNF- $\alpha$  (« Tumor Necrosis Factor » alpha) en augmentant l'expression des protéines de jonctions serrées occludine et claudine-1, tout en diminuant celle de la claudine-2. Aussi, le traitement avec du givinostat (pan-HDACi) accélérât la cicatrisation épithéliale *in vitro* mais également *in vivo* chez des souris soumises au DSS, ces effets régénératifs étant dus à une augmentation de l'expression de TGF $\beta$ 1 (« Transforming Growth Factor » beta 1) suite à l'inhibition des HDACs (Friedrich *et al.*, 2019). Une augmentation de l'expression de TGF $\beta$ 1 suite à l'inhibition des HDACs par du butyrate, du SAHA ou de la TSA avait déjà été rapportée dans une autre étude, cette régulation étant contrôlée par le facteur de transcription SP-1 (Martin-Gallausiaux *et al.*, 2018). Aussi, l'inhibition des HDACs induite par les AGCC renforce la fonction barrière de cellules épithéliales intestinales (Parada Venegas *et al.*, 2019). En effet, *in vitro*, il a été démontré que le butyrate favorise la formation de la barrière épithéliale *via* l'activation de STAT3 et l'inhibition des HDACs qui entraînent une augmentation de l'expression de l'interleukine (IL)-10RA, important pour la fonction barrière puisqu'elle réprime l'expression de la claudine-2, une protéine de jonction formant des pores para-cellulaires (Zheng *et al.*, 2017). Le butyrate favorise aussi la barrière épithéliale dans des cellules T84 *via* l'inhibition de HDAC1, qui restaure l'expression de Trek1, un canal potassique, dans les CEIS (H. Huang *et al.*, 2016). En outre, HDAC5 serait impliquée dans la régulation de la barrière intestinale. En effet, il a été observé que les patients souffrant d'une septicémie présentaient un niveau d'expression de HDAC5 plus élevé comparativement aux individus sains et le niveau d'expression de HDAC5 corrélait positivement avec l'expression de cytokines pro-inflammatoires, l'apoptose des cellules intestinales et avec l'expression de IFABP, un marqueur du dysfonctionnement de la barrière intestinale, suggérant qu'une forte expression de HDAC5 altère la fonction barrière de l'intestin (B. Li *et al.*, 2021). Aussi, dans un modèle *in vivo* de septicémie, le ciblage spécifique de HDAC5 *via* son « silencing » ou *via* son inhibition avec l'inhibiteur spécifique LMK-235 améliorait la survie des souris et réduisait la perméabilité intestinale ainsi que les dommages induits au niveau de l'épithélium intestinal.

### **c. HDACs et régulation des rythmes circadiens**

Il a très récemment été montré l'implication des HDACs dans les rythmes circadiens intestinaux, ces rythmes régulant notamment l'absorption des nutriments, la prolifération des entérocytes et le métabolisme (Hussain & Pan, 2009; Scheving, 2000). Les AGCC altèrent l'expression de gènes impliqués dans les rythmes circadiens au niveau de l'épithélium intestinal *via* un mécanisme dépendant de leur activité HDACi (Fawad *et al.*, 2022). En effet, le traitement d'organoïdes avec des AGCC ou des HDACi entraînait des retards de phase importants de l'expression de *Per2*, un gène clé de la régulation circadienne des gènes dont l'expression varie de manière cyclique. De plus, les retards de





**Figure 15 : Rôles des HDACs dans l'homéostasie intestinale.**

Les HDACs sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie intestinale en régulant la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, la fonction barrière ou les encore les rythmes circadiens.

phase n'étaient plus observés dans des organoïdes traités avec du butyrate et n'exprimant plus HDAC3, faisant de HDAC3 une HDAC d'intérêt dans le contrôle des rythmes circadiens au niveau intestinal.

L'ensemble des fonctions des HDACs décrites ci-dessus montre clairement que les HDACs ont des rôles extrêmement variés dans de nombreux processus et plus particulièrement au niveau intestinal (**Figure 15**). Les HDACs ont particulièrement été étudiées pour leurs nombreux rôles dans le contrôle de la réponse inflammatoire dans le but de proposer leur ciblage à des fins thérapeutiques.

## **5. Rôles des HDACs dans la régulation de l'inflammation**

De nombreuses études ont montré que les HDACs étaient impliquées dans l'immunité innée et adaptative en régulant les voies de signalisation des TLRs (« Toll-Like Receptor »), de l'interféron (IFN) mais également *via* la régulation du développement de lymphocytes B et T et la présentation des antigènes (Shakespear *et al.*, 2011; Sweet *et al.*, 2012).

### **a. Rôle des HDACs dans les cellules immunitaires**

L'observation que les HDACi présentaient des effets anti-inflammatoires a laissé penser que les HDACs pouvait être impliquées dans les mécanismes associés au développement de l'inflammation. Les effets anti-inflammatoires des HDACi ont commencé à être décrits il y a plusieurs années maintenant. Par exemple, il a été montré que l'inhibition des HDACs réduisait la production de cytokines pro-inflammatoires dans des cellules mononuclées du sang et réduisait l'inflammation systémique *in vivo* (Leoni *et al.*, 2005). L'effet anti-inflammatoire des HDACi a également été démontré avec les AGCC (Parada Venegas *et al.*, 2019). Le butyrate contribue à la réduction de l'inflammation en induisant l'expression de I $\kappa$ B $\alpha$  ce qui mène à l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B, en inhibant la voie IFN- $\gamma$ /STAT1 et en activant la fonction anti-inflammatoire de PPAR $\gamma$  (Couto *et al.*, 2020). Aussi, le butyrate inhibe, *via* son activité HDACi, l'expression et la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires comme NO, IL-6 ou IL-12 *in vitro* suite à la stimulation de macrophages dérivés de la moelle osseuse avec du LPS. De la même manière, le butyrate bloque l'expression de médiateurs pro-inflammatoires dans des macrophages issus du côlon de souris et stimulés avec du LPS ainsi que dans des macrophages issus du côlon de souris traitées avec du butyrate (Chang *et al.*, 2014). Le butyrate induit également la différenciation monocyte-macrophage et favorise l'activité antimicrobienne des macrophages *via* l'inhibition de HDAC3, et induit la polarisation des macrophages vers le phénotype anti-inflammatoire M2 (Ji *et al.*, 2016; Schulthess *et al.*, 2019). Les AGCC favorisent la différenciation des lymphocytes T régulateurs, qui sont des acteurs importants pour limiter les réponses inflammatoires, *via* l'augmentation de l'expression de *Foxp3* (Arpaia *et al.*, 2013; Furusawa *et al.*, 2013). Il a également été démontré que les AGCC favorisaient la génération de lymphocytes B régulateurs et producteurs d'IL-10 *via* leur activité HDACi, qui active la voie de signalisation MAPK (Zou *et al.*, 2021). Le butyrate limite également les fonctions des neutrophiles. En effet, grâce à son activité HDACi, le butyrate entraîne une

réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires par les neutrophiles issus de patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et améliore la sévérité de la colite chez des souris sous DSS *via* l'inhibition de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et la production de NETs (« Neutrophil Extracellular Traps ») (Li *et al.*, 2021). Toutefois, les HDACi peuvent entraîner des effets à la fois pro- et anti-inflammatoires. Par exemple, il a été démontré que le traitement de macrophages avec le MS-275 résultait en une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12) mais également de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, l'augmentation de l'IL-10 étant liée à une augmentation de l'activité de NF- $\kappa$ B, de son acétylation, de sa translocation nucléaire et de sa fixation au promoteur de l'IL-10 dans les macrophages (Leus *et al.*, 2017). Ainsi, l'ensemble de ces données montre la complexité de la régulation de l'inflammation par les HDACs dans les cellules immunitaires, les effets étant dépendants du type cellulaire ou de l'inhibiteur utilisé.

## **b. Rôles des HDACs dans les maladies inflammatoires**

### **i. Arthrite rhumatoïde (AR)**

Des effets bénéfiques des HDACi ont été observés dans des maladies inflammatoires, démontrant l'implication des HDACs dans ces pathologies. Dans le contexte de l'arthrite rhumatoïde (AR), il a été mis en évidence que l'inhibition des HDACs bloquait la production d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  par les macrophages issus des articulations enflammées de patients souffrant d'AR et induisait également leur apoptose (Grabiec *et al.*, 2010). Une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoire a également été observée dans des biopsies synoviales de patients souffrant d'AR traitées avec des HDACi. Grabiec et collaborateurs ont aussi mis en évidence dans une autre étude que le traitement de synoviocytes avec des HDACi inhibait la production d'IL-6 *via* la réduction de la stabilité de l'ARNm (Grabiec *et al.*, 2011). Aussi, l'activité HDAC était augmentée dans des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs) issus de patients atteints de AR et le traitement des PBMCs des patients atteints de AR avec des HDACi réduisait la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF (Gillespie *et al.*, 2012). *In vivo*, l'utilisation de HDACi dans différents modèles d'arthrite améliorait la sévérité de l'arthrite en limitant l'inflammation des articulations et la destruction du cartilage et des os (Joosten *et al.*, 2011). De la même manière, des effets bénéfiques d'inhibiteurs spécifiques des HDACs de classe I sur l'inflammation et la perte osseuse ont été rapportés dans un modèle d'arthrite (Cantley *et al.*, 2015). HDAC6 semble particulièrement impliquée dans l'AR. Dans une étude récente, l'inhibition spécifique de HDAC6 diminuait la production de cytokines et de métalloprotéinases par les synoviocytes issues de patients atteints de AR et inhibait leur migration. De manière intéressante, dans un modèle d'arthrite *in vivo*, l'inhibition de HDAC6 réduisait l'inflammation synoviale et la destruction des articulations, améliorant globalement l'arthrite d'un point de vue clinique (J. K. Park *et al.*, 2021).

## ii. Spondylarthrite ankylosante (SA)

Les HDACs seraient également impliquées dans la spondylarthrite ankylosante (SA). En effet, l'expression de HDAC3 est augmentée dans les PBMCs issus de patients atteints de SA et il a été démontré que HDAC3 se fixait au niveau du promoteur du gène codant pour le miARN-130a, ce qui inhibe son expression et l'empêche de réprimer l'expression de TNF-1 $\alpha$  dans les PBMCs (Jiang & Wang, 2016). Aussi, une autre étude a montré que HDAC1, plus exprimé chez les patients atteints de SA, favorisait la prolifération, la réponse inflammatoire et la différenciation ostéogénique dans des fibroblastes issus de patients atteints de SA (Zeng *et al.*, 2010). Ces résultats pointent vers un rôle prédominant des HDACs de classe I dans la physiopathologie de la SA.

Ainsi, ces travaux montrent que les HDAC sont impliquées dans divers processus inflammatoires pathologiques et que de nombreuses études visent à comprendre les mécanismes mis en jeu pour déterminer l'intérêt thérapeutique de certains HDACi.

## c. Rôle des HDACs dans l'inflammation intestinale

Il a été démontré dans différentes études que les HDACi pouvaient limiter l'inflammation intestinale. Dans une première étude menée par Glauben et collaborateurs, l'inhibition des HDACs (SAHA et acide valproïque) résultait en une diminution de la production des cytokines *in vitro* dans des monocytes et lymphocytes T stimulés avec du LPS, et de manière plus intéressante, ces inhibiteurs réduisaient la sévérité de la colite dans deux modèles différents d'inflammation intestinale, suite à la réduction des cytokines pro-inflammatoires et l'induction de l'apoptose (Glauben *et al.*, 2006). De manière similaire, il a été observé que le givinostat et le SAHA diminuaient l'activité clinique de la colite induite au DSS chez les souris en réduisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et en augmentant la production d'IL-10 ou en diminuant l'accumulation de cellules inflammatoires au niveau intestinal (Ali *et al.*, 2018; Glauben *et al.*, 2008). D'autres études ont montré l'effet bénéfique de l'inhibition des HDACs dans différents modèles d'inflammation intestinale. Par exemple, le butyrate de sodium ou des dérivés du butyrate inhibe la désacétylation de H3, la signalisation NF- $\kappa$ B et réduit le recrutement de neutrophiles dans le côlon de souris, atténuant la colite (C. Lee *et al.*, 2017; Simeoli *et al.*, 2017). Il a été observé une diminution de la sévérité de la colite induite au DSS caractérisée par une réduction de l'apoptose et de l'inflammation dépendante de NF- $\kappa$ B ainsi qu'une amélioration de la fonction barrière chez des souris traitées avec un inhibiteur des HDACs de classe I, le MS-275 (C. Li *et al.*, 2020). D'une manière un peu différente, il a été démontré qu'une inhibition globale des HDACs avec le SAHA ou la TSA réduisait la colite en augmentant le nombre et la fonction des lymphocytes T régulateurs *via* l'acétylation de Foxp3 (De Zoeten *et al.*, 2010; Tao *et al.*, 2007). Ces résultats n'ont pas été obtenus avec le MS-275 qui inhibe seulement les HDACs de classe I, démontrant un potentiel rôle des HDACs de classe II dans le contrôle de l'inflammation (De Zoeten *et al.*, 2010). Notamment, HDAC9 serait en cause puisque les souris HDAC9<sup>-/-</sup> présentaient une résistance face à la colite induite

au DSS. Aussi, il semblerait que HDAC6 joue un rôle important dans la régulation de l'inflammation intestinale puisque plusieurs études ont montré que son inhibition spécifique avait un effet protecteur dans différents modèles de colite *via* l'augmentation de l'activité suppressive des lymphocytes T régulateurs, le blocage de la signalisation NF- $\kappa$ B ou l'inhibition de l'infiltration de lymphocytes B (de Zoeten *et al.*, 2011; Do *et al.*, 2017; J. W. Lee *et al.*, 2020; T. Liu, Wang, *et al.*, 2017).

De manière plus spécifique, les souris déficientes pour *Hdac1/Hdac2* dans les CEIs présentaient une altération de la fonction barrière ainsi qu'une inflammation intestinale chronique de bas grade (Turgeon *et al.*, 2013). Aussi, ces souris étaient plus sensibles à une colite induite au DSS comparativement aux souris sauvages avec une augmentation de la perméabilité intestinale et de l'expression de gènes pro-inflammatoires tandis que la seule perte de *Hdac2* au niveau des CEIs protégeait contre la colite et n'induisait pas d'altérations de l'homéostasie intestinale (Turgeon *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent que HDAC1 et HDAC2 régulent la réponse inflammatoire au niveau des CEIs, avec des rôles à la fois redondants et spécifiques. Gonneaud et collaborateurs ont montré que HDAC1 était un régulateur majeur de la réponse inflammatoire dépendante de IL-1 $\beta$  dans les CEIs, *via* la régulation transcriptionnelle spécifiques des gènes (Gonneaud *et al.*, 2014). La restriction de la réponse inflammatoire médiée par HDAC1 pourrait passer par la régulation de p65 puisque la déplétion de HDAC1 dans des CEIs conduit à la localisation nucléaire prolongée de p65 suite à une induction par l'IL-1 $\beta$ . Cependant, dans des monocytes stimulés avec du TNF, l'inhibition de HDAC1 et HDAC2 entraîne une diminution significative de l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  et le TNF, démontrant que HDAC1 et HDAC2 peuvent également avoir un rôle pro-inflammatoire en fonction du type cellulaire (Algate *et al.*, 2020). Concernant HDAC3, il semblerait qu'elle ait un rôle protecteur. Par exemple, dans un modèle d'infection par *Citrobacter rodentium*, HDAC3 protège les souris en régulant positivement l'expression d'IL-18 par les CEIs. L'IL-18 va, quant à elle, permettre la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par des lymphocytes intraépithéliaux afin de protéger l'hôte contre l'infection (Navabi *et al.*, 2017). De plus, des souris déficientes pour HDAC3 spécifiquement dans les macrophages sont plus susceptibles à une infection par *Pseudomonas aeruginosa*, car l'absence de HDAC3 entraîne, entre autres, une augmentation de l'acétylation au niveau du promoteur de la cathepsine B augmentant son expression et inhibant à terme l'activation de NF- $\kappa$ B (L. Yang *et al.*, 2022).

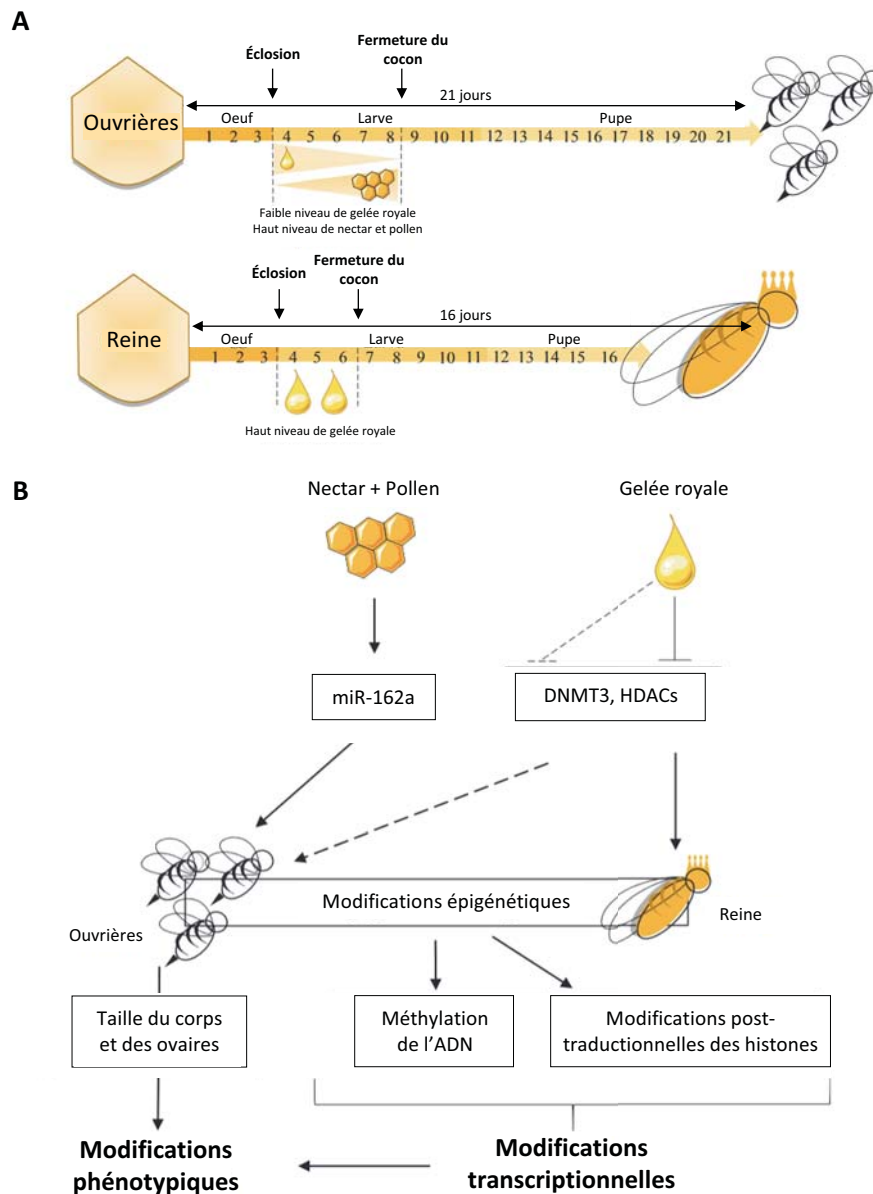
Il est important de noter que les résultats obtenus avec des inhibiteurs de HDACs et avec des délétions génétiques de HDACs sont le plus souvent opposés. En effet, la plupart des études s'accordent pour conclure sur le rôle anti-inflammatoire des HDACi alors que la délétion des HDACs mène à une susceptibilité augmentée ou diminuée des animaux à l'inflammation intestinale. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que, le plus souvent, les inhibiteurs utilisés dans les études ne ciblent pas spécifiquement une HDAC ni un seul type cellulaire. À la vue des rôles multiples de chacune des HDACs ainsi que leur spécificité de fonction organe-dépendant, seule l'approche de délétion génétique

peut permettre de conclure sur le rôle de chacune des HDACs dans un tissu particulier. Cependant, les études faisant intervenir des inhibiteurs de HDACs seront plus facilement transposables chez les patients que les études réalisées sur des animaux génétiquement modifiés.

En plus de l'implication des HDACs dans diverses pathologies telles que les cancers ou les maladies inflammatoires comme présenté dans cette partie, les HDACs sont également mises en cause dans d'autres pathologies chroniques comme le diabète, l'obésité, l'asthme ou la fibrose pulmonaire idiopathique (Bhavsar *et al.*, 2008; Dewanjee *et al.*, 2021; Gatla *et al.*, 2019; Korfei *et al.*, 2022; Nijhawan *et al.*, 2020).

L'ensemble de ces travaux montre à quel point les HDACs sont des acteurs importants dans le maintien de l'homéostasie et que leur dérégulation peut participer au développement/maintien de maladies, faisant de ces régulateurs épigénétiques des cibles thérapeutiques intéressantes.





**Figure 16 : Effets du régime alimentaire sur le développement des abeilles.**

**A : Cycle de développement des abeilles.** Après l'éclosion des œufs, toutes les larves vont recevoir de la gelée royale. Cependant, les larves destinées à être des abeilles ouvrières reçoivent aussi du nectar et du pollen.

**B : Effets épigénétiques du régime alimentaire sur le développement des abeilles.** La gelée royale a un effet inhibiteur sur DNMT3 et sur les HDACs résultant en des modifications de la méthylation de l'ADN et des modifications post-traductionnelles des histones, ce qui va conduire à des modifications transcriptionnelles et, ultimement, à des modifications phénotypiques. Le miR-162a, enrichi dans le pollen et le nectar des abeilles, ouvrières entraîne des retards de développement, diminuant la taille du corps et des ovaires des abeilles (adaptée de Gimier *et al.*, 2018).

DNMT : ADN méthyltransférase, HDACs : Histone désacétylase.

## Deuxième partie : Modulations des marques épigénétiques

---

### I. Impact de l'environnement sur les marques épigénétiques

Au cours de sa vie, l'Homme est exposé à de nombreux facteurs environnementaux, qui forment ce que l'on appelle l'exposome, et qui peuvent impacter les marques épigénétiques. Dans cette partie, nous allons décrire les facteurs environnementaux identifiés comme capables de moduler les marques épigénétiques et présenter les mécanismes associés.

#### 1. Régime alimentaire

##### a. Chez les abeilles

Un exemple bien connu de l'influence de la nutrition sur les marques épigénétiques et caractérisé depuis de nombreuses années, est le processus de développement et de différenciation de castes « reine/ouvrière » chez les abeilles. Les abeilles ouvrières et reines sont différentes que ce soit au niveau de la morphologie, de la capacité de reproduction, du comportement ou de la durée de vie malgré le partage d'un patrimoine génétique identique. Durant les 72h suivant l'éclosion, les larves d'abeilles reçoivent de la gelée royale. Cependant, le régime des larves destinées à être des abeilles ouvrières va être modifié pour du pollen et du nectar tandis que les larves destinées à être reines continueront à être nourries avec de la gelée royale (**Figure 16A**) (W. Mao *et al.*, 2015; Y. Wang *et al.*, 2016). Les différences de phénotype observées sont dues à des modifications épigénétiques induites par ce régime alimentaire différent. Effectivement, la composition nutritionnelle de la gelée royale affecte le processus de méthylation de l'ADN durant le développement des abeilles. Notamment, les abeilles ouvrières présentent un profil de méthylation unique au niveau du cerveau, plus de 80% de gènes différentiellement méthylés étant hyperméthylés chez les larves d'abeilles futures ouvrières. De plus, il a été montré que le « silencing » de *DNMT3* dans les larves nouvellement écloses avait le même effet qu'un régime exclusif avec de la gelée royale résultant en une forte proportion d'abeilles reines avec des ovaires totalement développés (Kucharski *et al.*, 2008). Concernant les modifications post-traductionnelles des histones, il a été révélé qu'un composé présent dans la gelée royale (10-HDA) possédait une activité inhibitrice vis-à-vis des HDACs et que les larves d'abeilles présentaient des différences caste-spécifiques au niveau de l'enrichissement en certaines modifications post-traductionnelles des histones, corrélant avec une expression différentielle des gènes (Spannhoff *et al.*, 2011; Wojciechowski *et al.*, 2018). Pour finir, un miRNA enrichi dans la nourriture des abeilles ouvrières, miR-162a, retarde le développement et diminue la taille du corps et des ovaires chez les abeilles, induisant le développement des abeilles ouvrières et évitant la différenciation en abeille reine (Zhu *et al.*, 2017). L'ensemble de ces études montrent que de multiples mécanismes épigénétiques sont

influencés par le régime alimentaire et participent à la différenciation de castes chez les abeilles (**Figure 16B**).

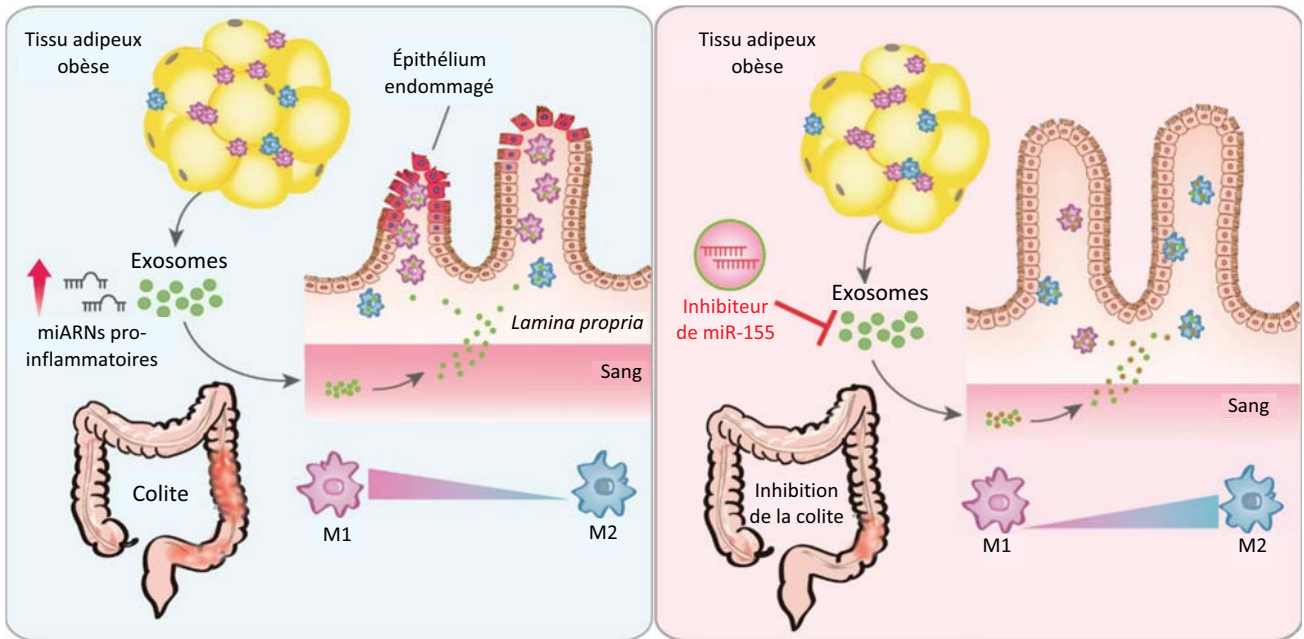
## **b. Le régime enrichi en graisses**

### **i. Effets sur la méthylation de l'ADN**

Il a été montré dans la littérature que la consommation d'un régime enrichi en graisses (« High Fat », HF) entraînait des modifications des marques épigénétiques dans différents types cellulaires. Concernant la méthylation de l'ADN, il a été démontré chez l'Homme que la consommation d'un régime enrichi en graisses sur une courte durée altérait le profil de méthylation de l'ADN au niveau du muscle squelettique et que ces altérations n'étaient que partiellement inversées 6-8 semaines après l'arrêt du régime (Jacobsen *et al.*, 2012). Ces observations ont également été réalisées dans des modèles murins. À titre d'exemple, 232 régions différentiellement méthylées ont été identifiées dans le tissu adipeux de souris sous régime HF comparativement à des souris sous régime contrôle (Multhaup *et al.*, 2015). Aussi, chez des rats, la consommation d'un régime HF résultait en une diminution de l'expression de *Dnmt1* dans les testicules et en une diminution du niveau global de méthylation de l'ADN dans les spermatozoïdes, les gènes différentiellement méthylés appartenant à des voies impliquées dans le développement embryonnaires comme Wnt, Hedgehog ou Notch (Deshpande *et al.*, 2020). Une hyperméthylation et une plus faible expression du gène *Phlda1* impliqué dans l'homéostasie des lipides au niveau hépatique ont été observées, la dérégulation de ce gène participant à la physiopathologie de l'obésité (P. Zhang *et al.*, 2017). Il a aussi été démontré que le régime HF induisait une hyperméthylation au niveau des promoteurs des gènes codant pour la *leptine* et *Pparg2* dans le tissu adipeux gonadique (Zwamborn *et al.*, 2017). De plus, il a été mis en évidence qu'un régime enrichi en graisses de type oméga 6 modulait les niveaux de méthylation de certains gènes dans la muqueuse colique des souris menant à une accumulation de facteurs pro-inflammatoires et prolifératifs, qui augmenteraient le risque d'inflammation et de cancer du côlon (Romagnolo *et al.*, 2019).

### **ii. Effets sur les modifications post-traductionnelles des histones**

Une diminution de l'accumulation de HDAC1 ainsi qu'une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 ont été observées dans la muqueuse colique des souris nourries avec le régime enrichi en graisses de type oméga 6 (Romagnolo *et al.*, 2019). De plus, des modifications de l'accessibilité de la chromatine au niveau hépatique chez des souris soumises à un régime HF comparativement à des souris sous régime contrôle ont été observées. De façon intéressante, une partie de ces changements persistait malgré le retour à un régime conventionnel (Leung *et al.*, 2016). Les sites qui restaient moins accessibles présentaient un enrichissement pour la marque H3K9me2, suggérant un rôle de cette modification post-traductionnelle dans le maintien des modifications de l'accessibilité de la chromatine. Une autre étude a identifié des changements au niveau de l'enrichissement de 15 modifications post-traductionnelles des histones dans le foie de souris soumis à un régime HF comparativement aux souris sous régime contrôle



**Figure 17 : Les exosomes sécrétés par le tissu adipeux viscéral exacerbe la sévérité de la colite via des miARNs pro-inflammatoires chez des souris nourries avec un régime High Fat (HF).**

Chez les souris sous régime HF, les exosomes sécrétés par le tissu adipeux viscéral contiennent davantage de miARNs pro-inflammatoires tels que miR-155. Les exosomes vont circuler jusqu'à atteindre la *lamina propria* où ils vont favoriser la polarisation des macrophages vers le phénotype inflammatoire M1, prédisposant les animaux à la colite. L'injection d'un inhibiteur de miR-155 encapsulé dans des exosomes dérivés du tissu adipeux viscéral permet de soulager la colite en favorisant la polarisation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire M2 (adaptée de Wei *et al.*, 2020).

(Nie *et al.*, 2017). D'autres travaux ont montré que la consommation d'un régime HF résultait en une forte diminution de l'expression du gène *Acly*, codant pour l'ATP citrate-lyase qui permet de synthétiser l'acétyl-CoA, le substrat utilisé pour l'acétylation des histones, dans le foie et le tissu adipeux blanc gonadique (Carrer *et al.*, 2017). Une diminution du niveau d'acétyl-CoA a également été observée dans le foie, le tissu adipeux gonadique et le pancréas tout comme des modifications du niveau d'acétylation des histones dans le pancréas et le tissu adipeux gonadique, l'acétylation de H3K23 étant significativement diminuée chez les souris sous régime HF. Aussi, la consommation d'un régime enrichi en graisses pouvait diminuer l'acétylation des histones et augmenter leur dégradation au niveau hépatique dans un modèle murin de stéatose hépatique non alcoolique (Arias-Alvarado *et al.*, 2021).

### iii. Effets sur les miARNs

Le régime HF peut également impacter l'expression de miARNs. En effet, une diminution de l'expression de miR-26a a été mise en évidence au niveau hépatique chez des souris sous régime HF, ce miARN étant impliqué dans la régulation de la sensibilité à l'insuline et le métabolisme des lipides et du glucose (Fu *et al.*, 2015). Aussi, il a été montré que la consommation d'un régime occidentalisé enrichi en graisses pouvait réduire l'expression des miARNs miR-143 et miR145a dans la muqueuse colique de souris, ces 2 miARNs étant importants pour réduire la colite induite par le DSS et la tumorigenèse colique (Dougherty *et al.*, 2021). De plus, il a été montré chez des souris que le régime HF modifiait le profil des miARNs dans les exosomes sécrétés par le tissu adipeux viscéral, en augmentant notamment les miARNs pro-inflammatoires, comme miR-155. Ces exosomes inflammatoires, en circulant efficacement dans la *lamina propria*, favorisaient la polarisation des macrophages vers le phénotype inflammatoire M1 prédisposant ainsi l'intestin à l'inflammation et expliquant l'exacerbation de la colite induite au DSS observée chez les souris sous régime HF (**Figure 17**) (Wei *et al.*, 2020). Le régime HF entraîne également une dérégulation de l'expression des miARNs dans différents tissus de hamster, démontrant que les effets du HF ne sont pas espèces spécifiques (Barbalata *et al.*, 2020).

Ainsi, l'ensemble de ces travaux montre que la consommation d'un régime enrichi en graisses peut avoir des répercussions sur les diverses régulations épigénétiques, pouvant ainsi prédisposer des individus à développer des pathologies.

### c. Les donneurs de groupements méthyles

Une méthylation aberrante de l'ADN chez l'adulte est liée au vieillissement et est impliquée dans diverses maladies comme le cancer (Dor & Cedar, 2018; Horvath & Raj, 2018). La méthylation de l'ADN et des histones est dépendante de la disponibilité en donneurs de groupements méthyles dérivés du régime alimentaire comme le folate, la choline, la bétaine ou la méthionine. De nombreuses études se sont intéressées à l'impact d'un régime alimentaire déplété ou enrichi en donneurs de groupements

méthyles sur les marques épigénétiques (Anderson *et al.*, 2012; Ideraabdullah & Zeisel, 2018; Mahmoud & Ali, 2019). Par exemple, il a été observé chez des patients présentant des polypes adénomateux qu'une supplémentation en acide folique durant 6 mois permettait d'inverser l'hypométhylation globale de l'ADN dans le côlon (O'Reilly *et al.*, 2016). De plus, les résultats d'une méta-analyse d'essais cliniques ont montré que la supplémentation en acide folique seul ou en combinaison avec la vitamine B12 résultait en une augmentation de la méthylation globale de l'ADN même si aucun n'impact sur la méthylation de l'ADN n'a pu être observé dans certaines études (Amenyah *et al.*, 2020).

Denizot et collaborateurs ont observé chez des souris nourries avec un régime appauvri en donneurs de groupements méthyles, une hypométhylation du promoteur du gène *CEACAM6*, important dans la maladie de Crohn, menant à une expression anormale de ce gène dans les cellules épithéliales coliques des souris (Denizot *et al.*, 2015). De manière complémentaire, une hyperméthylation du promoteur du gène *CEACAM6* associée à une diminution de son expression a été rapportée chez des souris sous un régime enrichi en groupements de donneurs méthyles (Gimier *et al.*, 2020). De plus, de nombreux autres gènes ont vu leur expression dérégulée suite à la consommation d'un régime enrichi en donneurs de groupements méthyles.

#### **d. Autres facteurs alimentaires**

##### **i. La restriction calorique**

La malnutrition en général peut avoir des impacts au niveau épigénétique. Une étude a démontré que la malnutrition durant la première année de vie chez l'Homme résultait en des modifications du profil de méthylation de l'ADN au niveau sanguin à l'âge adulte avec l'identification de 134 régions génomiques différenciellement méthylées, incluant des gènes clés impliqués dans le développement neurologique et neuropsychiatrique (Peter *et al.*, 2016). La restriction calorique altère également l'expression des miARNs et des HDACs. En effet, la restriction calorique est capable d'inverser les altérations d'expression de miARNs induits par le vieillissement dans le muscle squelettiques de primates (Mercken *et al.*, 2013). Aussi, la restriction calorique permet de limiter l'augmentation de la protéine HDAC2 au niveau de l'hippocampe de souris induite par le vieillissement (Chouliaras *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent des effets bénéfiques de la restriction calorique au cours du vieillissement.

##### **ii. Les polyphénols**

Les polyphénols, présents principalement dans les fruits et les légumes, sont des molécules complexes aux propriétés antioxydantes capables de piéger les radicaux libres. Ils peuvent réduire le risque d'inflammation intestinale en modifiant le profil des miARNs ou en inhibant les HDACs (Vieujean *et al.*, 2022). Notamment, le resvératrol atténue la sévérité de la colite induite chimiquement et augmente la proportion de lymphocytes T régulateurs. Cet effet positif sur la colite serait dû à la diminution de l'expression de plusieurs miARNs (notamment les miR-31, let-7a et miR-132) dans les



ganglions mésentériques des souris traitées avec du resvératrol. En effet, ces miARNs ciblent des cytokines et facteurs de transcription impliqués dans la réponse anti-inflammatoire régulée par les lymphocytes T, miR-31 inhibant spécifiquement l'expression de *Foxp3*, le facteur de transcription clé des lymphocytes T régulateurs (Alrafas, Busbee, Nagarkatti, *et al.*, 2020). Une autre étude menée par la même équipe a démontré que le resvératrol était aussi capable de diminuer l'expression des HDACs dans les ganglions mésentériques de souris traitées avec le polyphénol et que cette diminution était corrélée avec l'induction des lymphocytes T régulateurs dans un modèle murin de cancer colorectal (Alrafas, Busbee, Chitrala, *et al.*, 2020). Ces résultats suggèrent que l'inhibition des HDACs serait un des mécanismes par lequel le resvératrol régule la réponse immunitaire et prévient le développement du cancer colorectal.

### iii. L'alcool

La consommation d'alcool impacte également l'épigénome (Habash *et al.*, 2022; L. Wu *et al.*, 2021). Par exemple, la consommation d'alcool altère les profils de méthylation de l'ADN durant l'hépatocarcinogénèse et est liée à l'hypométhylation de LINE1 dans certaines tumeurs (Hlady *et al.*, 2014; Schernhammer *et al.*, 2010). Aussi, une consommation excessive d'alcool par des souris entraîne une dérégulation de l'expression des HDACs, associée au développement d'une stéatose et de lésions hépatiques (Kirpich *et al.*, 2012). Il a également été démontré qu'une consommation excessive chronique ou aiguë d'alcool par des souris résultait en un enrichissement en la marque H3K9ac au niveau du promoteur de *PNPLA3* menant à une augmentation de son expression dans le foie (Restrepo *et al.*, 2017). Au niveau intestinal, il a été observé que l'exposition chronique à de l'éthanol augmentait l'expression du miARN miR-122a, ce qui entraînait une diminution de l'expression de l'occludine menant à une augmentation de la perméabilité intestinale (H. Zhao *et al.*, 2015). De plus, l'expression de miR-155 est également augmentée dans l'intestin grêle de souris consommant chroniquement de l'alcool. Les souris déficientes pour miR-155 sont protégées de l'augmentation d'endotoxines dans le sérum et de l'activation de TNF- $\alpha$  et NF- $\kappa$ B induites par l'alcool, démontrant que miR-155 est impliqué dans l'inflammation intestinale et la dysfonction de la barrière consécutives à la consommation chronique d'alcool (Lippai *et al.*, 2014).

Ainsi, le régime alimentaire dans sa globalité ou certains composants spécifiques peuvent impacter l'épigénome entraînant des effets plus ou moins bénéfiques pour l'homéostasie et la santé. Toutefois, l'Homme est également exposé à d'autres facteurs présents dans notre environnement qui peuvent eux aussi altérer les marques épigénétiques.

## 2. Le tabac

### a. Effets sur la méthylation de l'ADN

L'impact du tabac au niveau épigénétique a été largement étudié. Plusieurs études ont montré que le tabagisme entraînait des altérations au niveau des profils de méthylation de l'ADN et que ces modifications étaient associées avec la quantité et la durée de l'exposition à la cigarette. De plus, il a été observé que la méthylation au niveau de certains *loci* génétiques était réversible suite à l'arrêt du tabagisme tandis que d'autres modifications peuvent perdurer même plusieurs décennies après l'arrêt de la cigarette, ce qui suggère que les modifications épigénétiques induites par la cigarette pourraient exposer les anciens fumeurs à des risques néfastes pour leur santé sur le long-terme (Ambatipudi *et al.*, 2016; Joehanes *et al.*, 2016; Kaur *et al.*, 2019; S. Li *et al.*, 2018; McCartney *et al.*, 2018; Wan *et al.*, 2012; Wilson *et al.*, 2017; D. Zong *et al.*, 2019). En effet, il a été montré que presque un tiers des gènes humains connus étaient différentiellement méthylés dans les cellules sanguines de fumeurs comparativement à des personnes n'ayant jamais fumé. La majorité des sites différentiellement méthylés étaient revenus à des niveaux comparables aux non-fumeurs dans les 5 ans suivant l'arrêt de la cigarette tandis que certains gènes méthylés ne sont jamais revenus au niveau des non-fumeurs, même 30 années après l'arrêt du tabac (Joehanes *et al.*, 2016).

### b. Effets sur les modifications post-traductionnelles des histones

Des altérations au niveau des modifications post-traductionnelles des histones (acétylation, méthylation ou phosphorylation) sont également induites par le tabac (Kaur *et al.*, 2019; D. Zong *et al.*, 2019). Une augmentation de l'acétylation de l'histone H4 a été observée dans des tissus pulmonaires de fumeurs comparativement à des non-fumeurs ou des anciens fumeurs tandis que les anciens fumeurs présentaient une augmentation de l'acétylation de H3 comparativement à des non-fumeurs et des anciens fumeurs (Szulakowski *et al.*, 2006). Il a aussi été observé une réduction de l'activité HDAC globale dans des cellules sanguines issues de fumeurs comparativement à des non-fumeurs (Y. Chen *et al.*, 2012). De plus, chez des rats, l'exposition à de la fumée de cigarette augmentait l'acétylation de H3K9 associée à une diminution de l'expression de HDAC1 au niveau pulmonaire, l'enrichissement en la marque H3K9ac entraînant l'augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (X. Chen *et al.*, 2015). Une augmentation de l'expression de *Hdac2*, *Hdac4* mais également de *Hat1*, *Dnmt1*, *Dnmt3a* et *Dnmt3b* a également été mise en évidence dans des poumons de souris exposées à de la fumée de cigarette durant 3 jours comparativement à des souris non exposées, ces dérégulations étaient associées à une augmentation de l'acétylation de H3K56 (Sundar & Rahman, 2016). Toutefois, d'autres études sont nécessaires pour comprendre l'impact des modifications d'acétylation des histones et de l'expression des HDACs au niveau pulmonaire. Aussi, *in vitro* et dans le poumon des souris exposées à de la fumée de cigarette, un enrichissement en la marque activatrice H3K4me3 et une diminution des marques répressives H3K9me3 et H4K20me3 ont été observés au niveau du promoteur du gène *Nlrp10*,

augmentant son expression. Ainsi, ces modifications post-traductionnelles des histones expliqueraient l'induction de la réponse inflammatoire régulée par *Nlrp10* dans les poumons des souris en réponse à l'exposition à la fumée de cigarette (Kaur *et al.*, 2018).

### c. Effets sur l'expression des miARNs

Le profil d'expression des miARNs est aussi altéré par le tabagisme (Kaur *et al.*, 2019; Vrijens *et al.*, 2015; D. Zong *et al.*, 2019). Willinger et collaborateurs ont notamment caractérisé une signature de 6 miARNs associés au tabagisme dans les cellules sanguines de fumeurs, les miARNs identifiés étant associés avec des marqueurs inflammatoires systémiques et à une fonction pulmonaire réduite (Willinger *et al.*, 2017). De plus, une diminution de l'expression des miARNs a été mise en évidence dans les macrophages alvéolaires de fumeurs comparativement à des non-fumeurs. Cet effet serait dû à la SUMOylation de DICER induite par la fumée de cigarette, ce qui réduirait son activité ribonucléase altérant ainsi la synthèse des miARNs (Gross *et al.*, 2014). Il a également été démontré que parmi les miARNs dérégulés suite au tabagisme, le miR-149-3p était significativement sous-exprimé et qu'une réduction du niveau de ce miARN pouvait participer à la réponse inflammatoire chez les patients souffrant de bronchopneumopathie chronique obstructive *via* l'activation de la voie de signalisation TLR4-NF- $\kappa$ B (Shen *et al.*, 2017). De manière intéressante, il a été observé que 3 mois après l'arrêt de la cigarette, 22 des 34 miARNs différenciellement exprimés chez les fumeurs comparativement aux non-fumeurs retournaient à un niveau normal contrairement aux 12 autres qui sont associés avec la carcinogenèse et avec les maladies respiratoires chroniques (G. Wang *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent que les modifications persistantes dans l'expression des miARNs induits par le tabagisme pourraient contribuer au développement de maladies affectant les poumons même après l'arrêt de la cigarette.

### 3. La pollution atmosphérique

La pollution atmosphérique est une combinaison des différents composés comme les particules fines, l'ozone, le dioxyde de nitrogène ou encore le monoxyde de carbone, le benzène ou le dioxyde de soufre. Ces différents composés peuvent induire des modifications épigénétiques que ce soit au niveau de la méthylation de l'ADN, des modifications des histones ou de l'expression de miARNs (Mukherjee *et al.*, 2021). Notamment, il a été démontré chez des enfants que l'exposition à des particules fines, l'ozone, le dioxyde d'azote ou le monoxyde de carbone était associée avec la méthylation de gènes immunorégulateurs comme *Foxp3*, *IL-4*, *IL-10* et *IFN- $\gamma$* , altérant la réponse immune. De plus, des changements de méthylation au niveau du promoteur de *Foxp3* et de l'*IL-10* étaient durables et significativement associés avec la pathogenèse de l'asthme (Prunicki *et al.*, 2018, 2021). Dans ce sens-là, il a préalablement été montré qu'une exposition augmentée des enfants à la pollution de l'air ambiant était associée à l'hyperméthylation du locus *Foxp3*, altérant la fonction des lymphocytes T régulateurs et augmentant la morbidité liée à l'asthme (Hew *et al.*, 2015; Nadeau *et al.*, 2010). Aussi, il a été observé

que la pollution de l'air liée au trafic pouvait altérer la méthylation de l'ADN et l'acétylation de H3K9 dans les cellules sanguines et les poumons de rats (R. Ding *et al.*, 2017). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques induisent également des modifications des marques histones chez les souris. En effet, il a été révélé que l'exposition de souris durant 7 jours dès leur naissance à un hydrocarbure aromatique polycyclique, le benzopyrène, diminuait l'acétylation de H3K14 au niveau du promoteur du gène *Star*, qui persistait même au stade adulte menant à une réduction de la production de testostérone (Liang *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent que la pollution pourrait entraîner des altérations épigénétiques qui perdureraient sur le long-terme. De plus, plusieurs études ont montré une dérégulation de l'expression des miARNs suite à l'exposition à des polluants atmosphériques et il a été suggéré que 5 miARNs spécifiques pourraient servir de biomarqueurs pour évaluer le risque de développer un cancer des poumons chez les individus exposés à la pollution atmosphérique (Sima *et al.*, 2021). Aussi, une exposition de 2h à de l'ozone est suffisante pour induire l'augmentation de l'expression de 10 miARNs 6h post-exposition dans des échantillons d'expectorations, ces miARNs étant impliqués dans les réponses inflammatoires et immunitaires (Fry *et al.*, 2014).

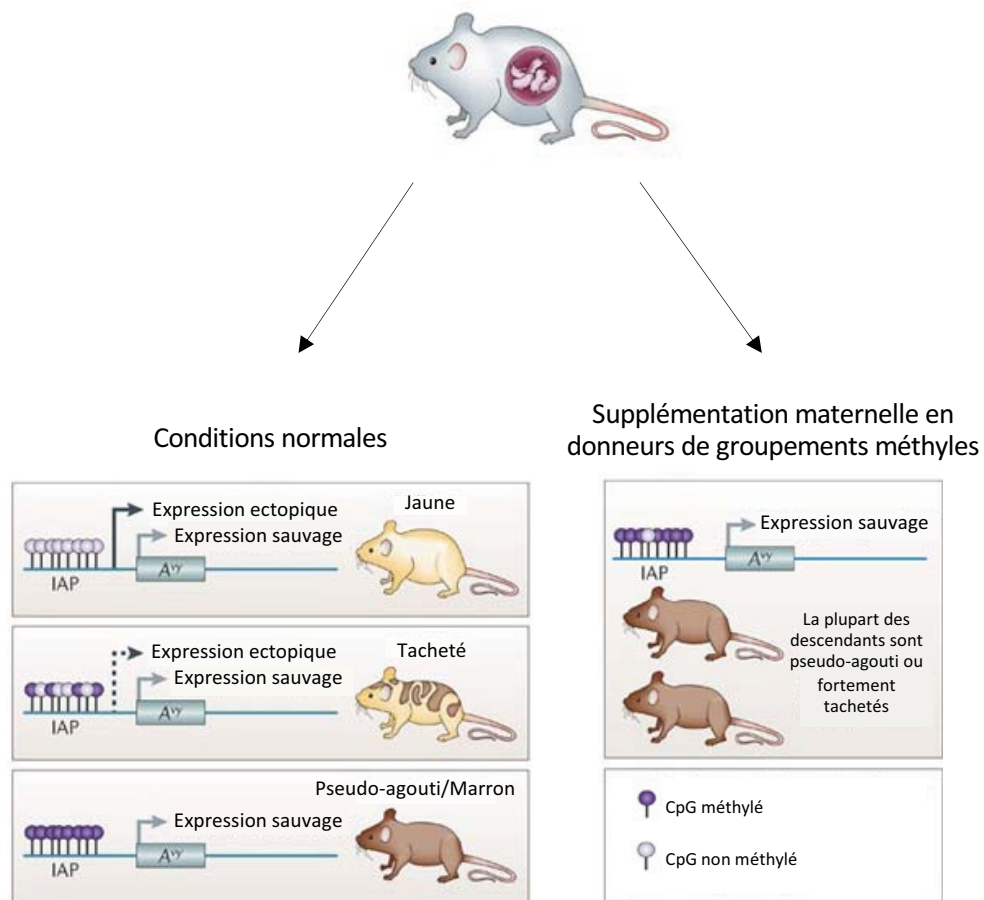
Ainsi, les données présentées ici montrent que l'environnement dans lequel évolue un hôte est important puisqu'il peut entraîner des modifications plus ou moins réversibles, qui vont avoir des impacts bénéfiques ou délétères sur différentes fonctions physiologiques pouvant favoriser l'apparition et le maintien de maladies. Toutefois, les facteurs présentés ici ne sont pas les seuls qui peuvent avoir des impacts au niveau épigénétique, il en existe d'autres comme l'activité physique dont les changements épigénétiques induits par sa pratique semblent varier en fonction de type d'exercice réalisé, de sa fréquence, de son intensité et de sa durée mais aussi en fonction de l'âge, du sexe et de la composition corporelle de l'individu (Barrón-Cabrera *et al.*, 2019; Tarnowski *et al.*, 2021).

#### **4. Transmission à la descendance de marques épigénétiques**

Certaines modifications épigénétiques peuvent affecter la lignée germinale et peuvent ne pas être effacées durant la reprogrammation épigénétique après la fécondation permettant un transfert transgénérationnel.

##### **a. Transmission maternelle**

Les études menées sur le modèle de souris Agouti ont participé à montrer que des modifications épigénétiques pouvaient éventuellement être transmises à la descendance. Dans ce modèle, les souris portant une mutation dominante dans le gène *agouti* ont une insertion d'une séquence IAP « Intracisternal A particle » régulée épigénétiquement. Lorsque la séquence IAP est hypométhylée, l'allèle muté est exprimé résultant en des souris obèses avec le pelage jaune et présentant une hyperinsulinémie. Lorsque IAP est hyperméthylée, l'allèle non muté est exprimé, les souris sont minces et marrons. Il a été observé que lorsque les mères étaient nourries avec un régime riche en donneurs de



**Figure 18 : Modifications épigénétiques induites par le régime alimentaire et transmises à la descendance : exemple du modèle Agouti.**

Les souris porteuses de l'allèle  $A^{vy}$  présentent une insertion d'une séquence IAP en amont du gène agouti. Une hypométhylation des dinucléotides CpG au niveau de la séquence IAP entraîne une expression ectopique du gène agouti résultant en des souris avec un pelage jaune. Lorsque IAP est hyperméthylée, l'allèle sauvage est exprimé donnant des souris au pelage agouti. Une supplémentation maternelle en donneurs de groupements méthyles entraîne l'hyperméthylation de la séquence IAP, les descendants présentent un pelage pseudo-agouti ou fortement tacheté (adaptée de Feil and Fraga, 2012).

IAP : Intracisternal A particle

groupements méthyles (méthionine, choline, bétaine, vitamine B12, folate), leur progéniture présentait une hyperméthylation de la séquence IAP et était plus susceptible d'être mince et marron, montrant que la composition du régime alimentaire de la mère permet de réguler l'expression des gènes dans la descendance (**Figure 18**) (Cropley *et al.*, 2006; Wolff *et al.*, 1998). Il a aussi été démontré des modifications au niveau des marques histones : les histones H3 et H4 étaient davantage acétylées chez les souris au pelage jaune tandis que les souris au pelage brun présentaient un enrichissement de la marque H4K20me3 (Dolinoy *et al.*, 2010).

Depuis, de nombreuses études ont montré que le mode de vie de la mère pouvait impacter la descendance *via* des modifications épigénétiques (Ideraabdullah & Zeisel, 2018; Kaspar *et al.*, 2020; Rasmussen *et al.*, 2021). Par exemple, il a été observé des différences au niveau de la méthylation de l'ADN d'enfants conçus durant une période où le régime alimentaire de la mère était pauvre en nutriments comparativement aux enfants dont l'apport nutritionnel de la mère était plus riche (Waterland *et al.*, 2010). Aussi, il a été montré qu'une supplémentation en donneurs de groupements méthyles chez des souris femelles avant, durant et après la gestation augmentait la susceptibilité des descendants à une colite induite au DSS. Cette susceptibilité augmentée était associée avec des altérations au niveau de la méthylation de l'ADN et de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation intestinale (Schaible *et al.*, 2011). Une autre étude a montré dans un modèle murin que la modulation du ratio folate/vitamine B12 dans le régime alimentaire de la mère entraînait des altérations au niveau de la méthylation de l'ADN et de l'expression de miARNs chez les descendants (Mahajan *et al.*, 2019). La consommation d'un régime enrichi en graisses par les mères résultait également en des modifications au niveau de la méthylation de l'ADN et de l'expression des gènes chez les descendants, les prédisposant au diabète (Q. Zhang *et al.*, 2019). Le tabagisme maternel peut également avoir des impacts épigénétiques chez la descendance (Kaur *et al.*, 2019; D. Zong *et al.*, 2019). En effet, Howe et collaborateurs ont analysé le méthylome dans des cellules issus du cordon ombilical d'enfants nés de mères fumeuses ou non et ils ont identifié plus de 10 000 sites CpG et 557 régions différentiellement méthylés dans des régions régulatrices clés du génome suite à l'exposition à la fumée de cigarette et (Howe *et al.*, 2019).

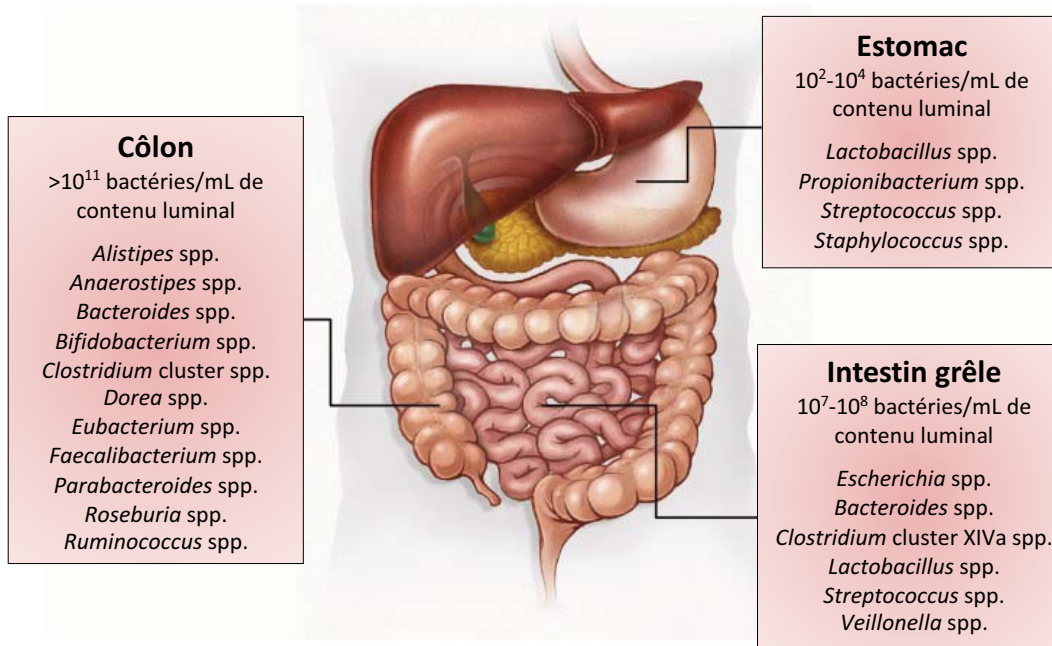
Le bisphénol A est un perturbateur endocrinien très répandu qui peut également entraîner des perturbations épigénétiques transgénérationnelles. L'exposition *in utero* à du bisphénol A entraîne des modifications sexe-spécifiques au niveau de la méthylation de l'ADN dans des amniocytes humains avec l'identification de plusieurs dizaines de régions différentiellement méthylées (Bansal *et al.*, 2019). Des modifications de l'expression de gènes dans des voies associées à des maladies métaboliques ont également été identifiées dans les amniocytes suite à une exposition au bisphénol A. Aussi, des rats nés de mères traitées avec du bisphénol A durant la gestation et la lactation présentaient des altérations de la méthylation de l'ADN au niveau hépatique ainsi qu'une augmentation de l'expression de *Dnmt3b*, ces modifications précédant le développement d'une insulino-résistance (Y. Ma *et al.*, 2013).



## b. Transmission paternelle

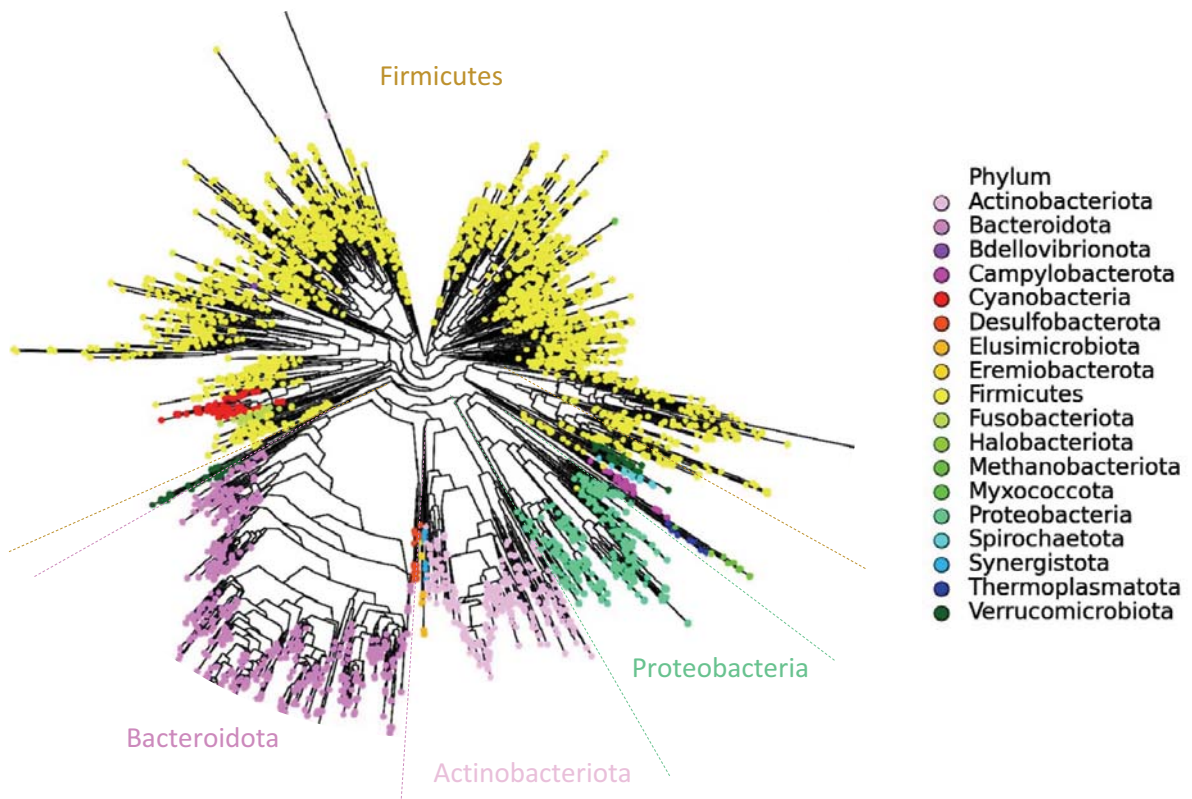
Une transmission d'altérations épigénétiques d'origine paternelle est également possible. En effet, une étude a montré qu'une colite induite au DSS chez des souris mâles affectait le profil de méthylation de l'ADN dans leurs spermatozoïdes mais également dans ceux de leurs descendants. De plus, l'héritage transgénérationnel de ces modifications était associé avec des altérations du transcriptome et du méthylome dans les cellules épithéliales intestinales chez les descendants issus des mâles traités au DSS, menant à des dérégulations de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique. Aussi, d'un point de vue phénotypique, les progénitures des mâles sous DSS avaient un poids plus faible et étaient plus sensibles à une colite induite au DSS comparativement aux descendants des souris n'ayant pas été traitées avec du DSS, démontrant qu'une colite paternelle entraîne une hérédité épigénétique de la susceptibilité à la colite (Tschurtschenthaler *et al.*, 2016). Il a également été démontré que le régime HF reprogrammait le profil de méthylation de l'ADN dans la lignée germinale de souris mâles, dérégulant l'expression de gènes impliqués dans le développement embryonnaire. Une partie de ces gènes dérégulés l'était également dans des embryons des souris engendrés par les mâles sous régime HF, démontrant que les défauts de méthylation étaient partiellement transmis aux embryons (Deshpande *et al.*, 2020). Un régime HF altérait également le profil d'expression d'ARNs non codants au niveau des spermatozoïdes, conférant des désordres métaboliques à la génération suivante comme une insulino-résistance ainsi qu'une altération de l'expression des gènes (Q. Chen *et al.*, 2016). Chez l'Homme et dans un modèle murin, l'exposition à la fumée de cigarette augmentait le niveau global de méthylation dans les spermatozoïdes. Il a également été noté une altération de la méthylation au niveau du gène *Dlk1* dans les spermatozoïdes des hommes et souris mâles soumis à la fumée de cigarette mais également dans le foie des descendants qui présentaient des désordres métaboliques tels qu'un métabolisme anormal du glucose et des lipides et une accumulation de gras dans le foie. Ainsi, l'exposition paternelle à la fumée de cigarette altère la méthylation du gène *Dlk1* qui est transmise à la descendance, résultant en une dérégulation de son expression et altérant le métabolisme des descendants (Y. Liu *et al.*, 2022).

Ainsi, l'environnement, en plus d'avoir des effets directs sur l'hôte, peut générer des altérations épigénétiques potentiellement transmissibles à la descendance. La période embryonnaire ainsi que le développement fœtal semblent être des périodes particulièrement sensibles aux changements environnementaux. Toutefois, la plupart des études s'intéressent principalement aux modifications de méthylation de l'ADN et du profil d'expression des miARNs dans une moindre mesure. Il serait intéressant d'étudier l'impact des divers facteurs sur les modifications post-traductionnelles des histones afin de mieux comprendre comment l'environnement module les marques épigénétiques.



**Figure 19 : Distribution et concentration des bactéries le long du tractus digestif de l'Homme.**

Les genres dominants dans l'estomac, l'intestin grêle et le côlon sont listés, basés sur des données de séquençage de l'ARNr 16S (adaptée de Rivière *et al.*, 2016).



**Figure 20 : Arbre phylogénétique du microbiote intestinal humain.**

Les bactéries du microbiote intestinal appartiennent majoritairement aux *phyla des* Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria et Proteobacteria (adaptée de Leviatan *et al.*, 2022).

Il a été démontré que l'exposition aux facteurs environnementaux cités ci-dessus entraînait des modifications de la composition du microbiote intestinal. Par conséquent, il est probable que les phénotypes observés suite à l'exposition à ces facteurs soient la conséquence de la modulation du microbiote intestinal plutôt qu'à un effet direct sur les marques épigénétiques. Dans ce sens, nous allons maintenant présenter les données de la littérature qui ont montré l'impact du microbiote intestinal sur les marques épigénétiques de l'hôte.

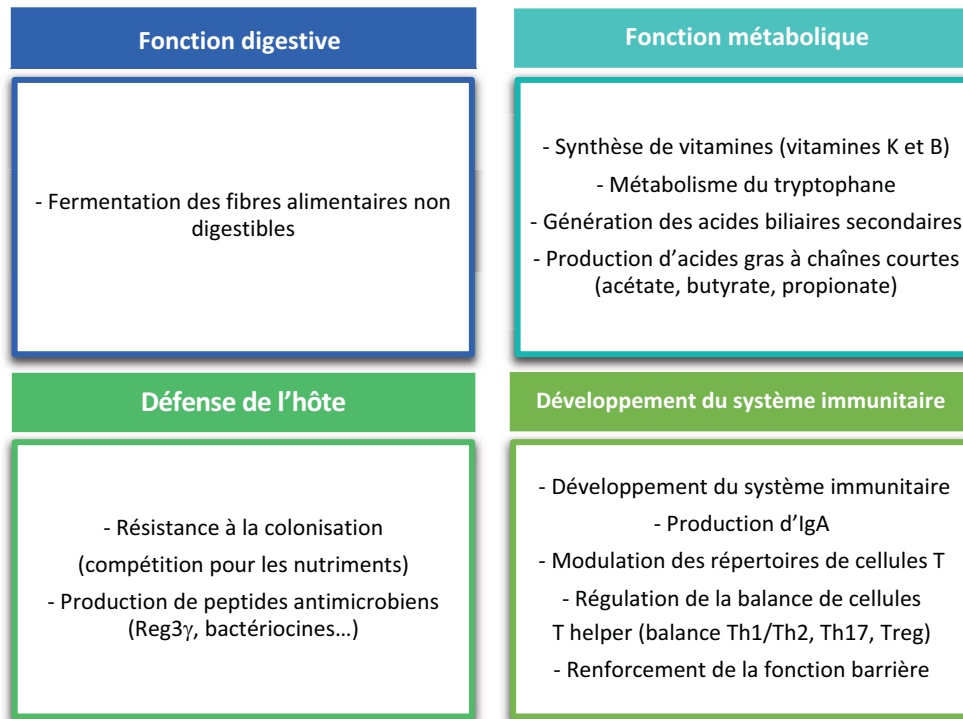
## II. Microbiote intestinal et épigénétique

### 1. Microbiote intestinal

Le corps humain est composé d'autant de cellules eucaryotes que de cellules microbiennes (Sender *et al.*, 2016). Le microbiote intestinal est majoritairement constitué de bactéries mais on retrouve également des champignons, des archées et des virus. L'abondance et la composition du microbiote intestinal varie en fonction de la région anatomique, le côlon hébergeant la plus grande partie des micro-organismes avec une densité de  $10^{11}$  à  $10^{12}$  bactéries/g de contenu luminal (**Figure 19**) (Dave *et al.*, 2012; Jandhyala *et al.*, 2015).

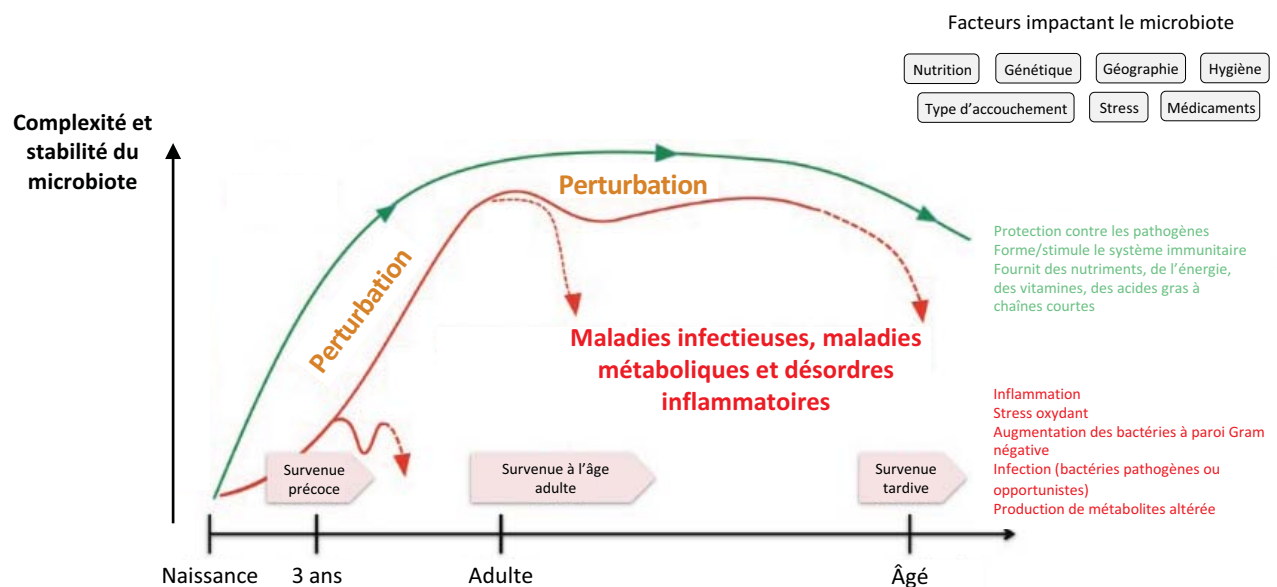
Le microbiote bactérien est le plus étudié, permettant la mise en évidence régulière de nouvelles espèces. Une récente étude a notamment créé un « set » de référence du microbiote intestinal humain incluant 3594 espèces bactériennes et il est estimé que le microbiome total, correspondant au métagénome, contiendrait environ 150 fois plus de gènes que le génome de l'Homme (Leviatan *et al.*, 2022; Prakash *et al.*, 2011). Les *phyla* majoritaires du microbiote intestinal sont les *Firmicutes*, les *Bacteroidetes*, les *Actinobacteria* et les *Proteobacteria*, qui représentent à eux quatre plus de 93,5% de la totalité du microbiote intestinal (**Figure 20**) (Arumugam *et al.*, 2011; Hugon *et al.*, 2015; J. Li *et al.*, 2014). La taxonomie établie par le National Center for Biotechnology Information (NCBI) a récemment fait l'objet de plusieurs modifications (Schoch *et al.*, 2020). Par exemple, les Firmicutes s'appellent maintenant Bacillota, les Bacteroidetes, Bacteroidota et les Proteobacteria sont dorénavant appelées Pseudomonadota. Cependant, l'ancienne nomenclature de la taxonomie des *phyla* dont la dernière version date de 2012 sera utilisée dans ce manuscrit pour une meilleure compréhension.

Il est maintenant bien connu et décrit que le microbiote intestinal joue un rôle clé dans la physiologie humaine. En effet, le microbiote est un acteur central dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale et de la structure du tractus gastro-intestinal. Il participe aussi à la production de vitamines non synthétisables par l'hôte (vitamines K et B), au métabolisme du tryptophane, à la génération d'acides biliaires secondaires, ou encore à la fermentation des fibres alimentaires non digestibles menant, notamment, à la production d'acides gras à chaînes courtes (AGCC) qui constituent une source d'énergie pour les cellules épithéliales du côlon (Agus & Sokol, 2019; Deleu *et al.*, 2021; LeBlanc *et al.*, 2011; Long *et al.*, 2017; M. Sun *et al.*, 2017). Le microbiote est également indispensable



**Figure 21 : Fonctions physiologiques du microbiote intestinal.**

Le microbiote intestinal contribue à la digestion, à la nutrition, au développement du système immunitaire et à la défense de l'hôte (adaptée de Nishida *et al.*, 2018).



**Figure 22 : Facteurs affectant la stabilité et la complexité du microbiote intestinal.**

La stabilité, la résilience et la diversité du microbiote intestinal peuvent être modifiées par des facteurs environnementaux ou génétiques (en gris) tout au long de la vie d'un individu. Ces facteurs peuvent altérer la composition et les propriétés fonctionnelles du microbiote pouvant éventuellement mener à la rupture de l'équilibre avec l'hôte. La perturbation de l'homéostasie peut participer au développement des maladies dès le plus jeune âge, chez le jeune adulte ou plus tardivement (adaptée de Kostic *et al.*, 2015).

au développement et à la maturation du système immunitaire, pour la tolérance vis-à-vis des micro-organismes commensaux, et pour la protection contre les pathogènes (**Figure 21**) (Jandhyala *et al.*, 2015; Nishida *et al.*, 2018). De plus, le microbiote intestinal est complexe et dynamique, il évolue en fonction des stimuli externes auxquels il est confronté (âge, régime alimentaire, médicaments, environnement, tabagisme...), et l'équilibre fragile qu'il forme avec l'hôte peut être rompu favorisant la survenue de maladies (**Figure 22**) (Gajendran *et al.*, 2018).

## **2. Impact du microbiote intestinal sur les marques épigénétiques**

### **a. Effet de la colonisation intestinale sur les marques épigénétiques**

#### **i. Microbiote intestinal et méthylation de l'ADN**

Il existe un lien entre le microbiote intestinal et les processus épigénétiques. D'un point de vue global, Poupeau et collaborateurs ont montré une hyperméthylation de l'ADN dans les CEIs coliques de souris axéniques comparativement à des souris élevées de manière conventionnelle (possédant un microbiote) et cette hyperméthylation était associée à une forte diminution de l'activité des enzymes TETs dans les colonocytes des souris axéniques. Ils ont également identifié que les régions différenciellement méthylées étaient proches de gènes contrôlant l'activation des lymphocytes « Natural Killer » (NK) et qu'il y avait une réduction de l'infiltration de lymphocytes NK dans l'épithélium des souris axéniques, démontrant que le remodelage épigénétique dans les CEIs altérait leur communication avec les cellules NK (Poupeau *et al.*, 2019). De la même manière, des différences de méthylation de l'ADN ont été observées dans les CEIs de souris axéniques comparativement à celles de souris conventionnelles. La méthylation au niveau de régions régulatrices était réduite chez les souris conventionnelles, dépendante de TET2/3, et résultait en une activation de gènes impliqués dans la réponse anti-inflammatoire et antibactérienne nécessaires au maintien de l'homéostasie intestinale (Ansari *et al.*, 2020). Aussi, des souris axéniques ayant subies une transplantation fécale présentaient une diminution du niveau de méthylation au niveau de régions précédemment identifiées, confirmant le rôle du microbiote dans la programmation épigénétique au niveau intestinal. Une autre étude a montré que la présence d'un microbiote modifiait le profil de méthylation de l'ADN ainsi que le transcriptome au niveau de 126 *loci* génomiques dans les CEIs (Pan *et al.*, 2018). De plus, ils ont observé que la plupart des effets dépendants du microbiote sur la méthylation de l'ADN étaient détectés précocement après la naissance tandis que les effets sur le transcriptome apparaissaient plus tard et augmentaient au cours du temps, indiquant que le développement postnatal constitue une fenêtre de développement critique pour l'empreinte induite par le microbiote intestinal.

De manière plus spécifique, l'enrichissement en certains groupes bactériens au sein du microbiote intestinal ou certains composants bactériens peuvent aussi entraîner des modifications épigénétiques. Notamment, il a été rapporté que les promoteurs de 568 gènes et 245 gènes étaient respectivement plus et moins méthylés chez des femmes enceintes présentant plus de *Firmicutes* au sein



de leur microbiote que chez les femmes avec plus de *Bacteroidetes* et de *Proteobacteria* (Kumar *et al.*, 2014). Aussi, chez des sujets obèses, le méthylome dans le sang et le tissu adipeux était différent en fonction du ratio *Bacteroidetes/Firmicutes* observés chez les individus, avec la mise en évidence de 258 gènes différentiellement méthylés entre les individus avec un fort ou faible ratio, suggérant que la méthylation de l'ADN est associée avec la composition du microbiote chez les sujets obèses (Ramos-Molina *et al.*, 2019).

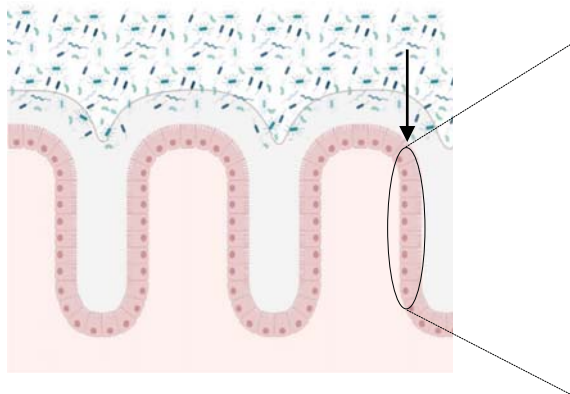
## ii. Microbiote intestinal et modifications post-traductionnelles des histones

Des altérations au niveau des modifications post-traductionnelles des histones microbiote-dépendantes ont été observées. En effet, des altérations au niveau de la marque H3K4me3 ont été mises en évidence dans des cellules épithéliales iléales de souris axéniques comparativement à des cellules de souris conventionnelles, les cibles épigénétiques sensibles au microbiote comprenant notamment des gènes impliqués dans la réponse antimicrobienne (D. Kelly *et al.*, 2018). Krautkramer et collaborateurs ont démontré que le microbiote intestinal induisait des modifications des niveaux d'acétylation et de méthylation globaux des histones au niveau du côlon mais aussi dans le foie et dans le tissu adipeux. Le niveau d'acétylation des histones H3 et H4 était notamment augmenté chez les souris colonisées avec un microbiote intestinal comparativement à des souris axéniques (Krautkramer *et al.*, 2016). Aussi, l'accessibilité de la chromatine, en particulier au niveau des « enhancers » de diverses cellules intestinales, est modifiée par le microbiote intestinal (Ansari *et al.*, 2020; Gury-BenAri *et al.*, 2016). Il a été montré que le microbiote intestinal induisait l'expression de *HDAC3* dans les CEIs, permettant son recrutement de manière cyclique au niveau de la chromatine où il produisait des oscillations diurnes synchronisées de l'acétylation des histones et de l'expression de gènes métaboliques, cette régulation cyclique étant perdue chez des souris axéniques (Kuang *et al.*, 2019). Comme décrit précédemment (Partie 1, III. 4. a.), *HDAC3* peut intégrer des signaux du microbiote intestinal pour réguler l'homéostasie intestinale (Alenghat *et al.*, 2013). De plus, une relation entre microbiote intestinal et *HDAC3* a été mise en évidence. En effet, il a été identifié que le microbiote était capable d'entraîner le recrutement de *HDAC3* au niveau du gène *Clec2e* codant pour une glycoprotéine de type lectine. Ce recrutement induisait une diminution de l'acétylation et une réduction de l'expression de ce gène, ce qui permettait de limiter l'adhésion de bactéries pathogènes, telles que *Citrobacter rodentium*, aux CEIs (V. Woo *et al.*, 2019).

D'autres études ont montré que le microbiote intestinal pouvait réguler l'expression de miARNs au niveau des CEIs et des cellules dendritiques, permettant notamment de contribuer à l'homéostasie et au maintien de la fonction barrière intestinale (Dalmaso *et al.*, 2011; Nakata *et al.*, 2017; N. Singh *et al.*, 2011; X. Xue *et al.*, 2011, 2014). En effet, la présence de bactéries commensales induit l'expression de miR-21-5-p dans les CEIs, résultant en une augmentation de la perméabilité intestinale via l'augmentation de l'expression de ARF4 (Nakata *et al.*, 2017). Ce résultat suggère que des interventions



### Effets du microbiote sur les marques épigénétiques dans les cellules épithéliales intestinales



#### Méthylation de l'ADN

- ↓ globale de la méthylation de l'ADN
- ↑ de l'activité TET

#### Marques histones

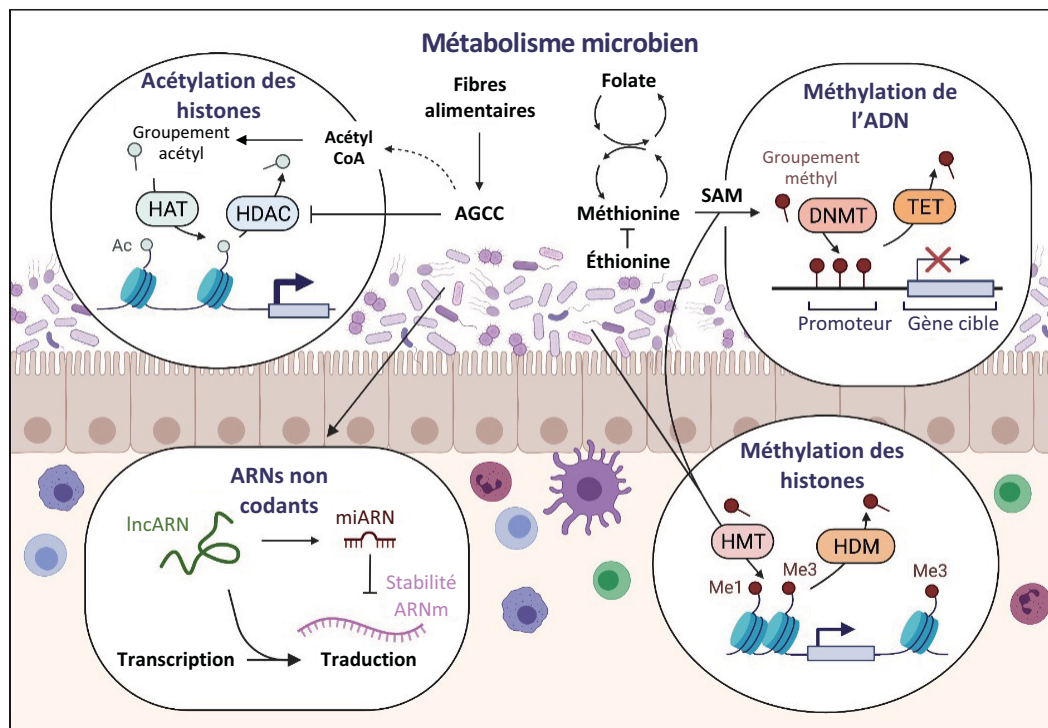
- ↑ de l'acétylation de H3 et H4
- ↑ expression de HDAC3
- ↑ recrutement de HDAC3 au niveau de la chromatine

#### Expression des miARNs

- ↑ expression miR-21-5-p

**Figure 23 : Impact du microbiote intestinal sur les marques épigénétiques.**

Grâce au recours à des animaux axéniques, il a pu être démontré que le microbiote intestinal modulait les marques épigénétiques, que ce soit au niveau de la méthylation de l'ADN, des modifications post-traductionnelles des histones ou encore au niveau de l'expression des miARNs. Les changements décrits dans le texte sont représentés sur la figure.



**Figure 24 : Le microbiote intestinal interagit avec l'épigénome de l'hôte via la production de substrats épigénétiques ou de régulateurs des enzymes « writers » / « erasers ».**

Les DNMTs/HMTs et les HATs ont besoin de donneurs de groupements méthyles et acétyles pour leur activité catalytique et le microbiote intestinal participe à la synthèse de ces molécules. Notamment, le folate produit par des bactéries commensales telles que *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* contribue à la génération de SAM, le substrat primaire pour la méthylation de l'ADN et des histones. Le microbiote dégrade également des fibres non fermentables menant à la production d'AGCC, connus pour être des inhibiteurs de HDACs (adaptée de Woo and Alenghat, 2022).

Ac : Acétylation, AGCC : Acides Gras à Chaînes Courtes, ARNm : ARN messager, DNMT : ADN méthyltransférase, HAT : Histone acétyltransférase, HDAC : Histone désacétylase, HMT : Histone méthyltransférase, HDM : Histone déméthylase, lncARN : ARN long non codant, Me : Méthylation, SAM : S- adénosylméthionine, TET : Ten-Eleven Translocation.

ciblant le microbiote intestinal pourraient contribuer à limiter ou à contrôler des dysfonctions au niveau de la barrière épithéliale.

### iii. Facteurs bactériens modulant les marques épigénétiques : exemple du LPS

Le LPS, un composant majeur de la membrane externe des bactéries à paroi Gram négative, est capable de modifier l'expression de certains miARNs. Par exemple, il peut diminuer l'expression de miR-19b, miR-497 ou augmenter celle de miR-215 respectivement dans des CEIs, des macrophages ou des fibroblastes, ce qui va promouvoir l'activation de NF- $\kappa$ B et la réponse pro-inflammatoire (Qiao *et al.*, 2018; B. Sun *et al.*, 2020; M. Zhang *et al.*, 2021). Aussi, il est connu que la cascade de signalisation induite suite à la détection du LPS entraîne des modifications de l'acétylation et de la phosphorylation des histones nécessaires à une activation transcriptionnelle totale, notamment avec l'acétylation de H3/H4 et la phosphorylation de H3S10, facilitant l'accès des facteurs de transcription à la chromatine et l'expression de gènes pro-inflammatoires (Dong & Hamon, 2020). Aussi, il a été observé que le LPS induisait une augmentation des marques histones H3K4me1/3 et H3K27ac au niveau de gènes associés à la réponse inflammatoire dans des macrophages murins (Simon *et al.*, 2016). Le LPS peut également moduler la méthylation de l'ADN. En effet, *in vitro* il a été observé que la stimulation de cellules endométriales bovines par du LPS résultait en une augmentation de l'expression des *DNMTs* et diminuait la méthylation au niveau des promoteurs des gènes codant pour l'IL-6 et l'IL-8, favorisant leur expression (J. Wang, Yan, *et al.*, 2018). Aussi, une diminution de l'expression de miR-506 associée à une augmentation de l'expression de *DNMT1* dans des CEIs en culture traitées avec du LPS ont été observées (Kempinska-Podhorodecka *et al.*, 2021).

Ainsi, le recours à des animaux axéniques dépourvus de microbiote intestinal a permis de révéler que les micro-organismes présents au niveau intestinal étaient importants pour réguler l'épigénome de l'hôte au niveau intestinal (**Figure 23**). Toutefois, ces travaux ont seulement permis d'établir un lien entre présence des micro-organismes et modulations épigénétiques. Des études plus approfondies ont permis de mettre en évidence les molécules bactériennes (métabolites) impliquées dans la régulation des marques épigénétiques des cellules hôtes.

## b. Effets induits par des métabolites produits par le microbiote

### i. Sur la méthylation de l'ADN

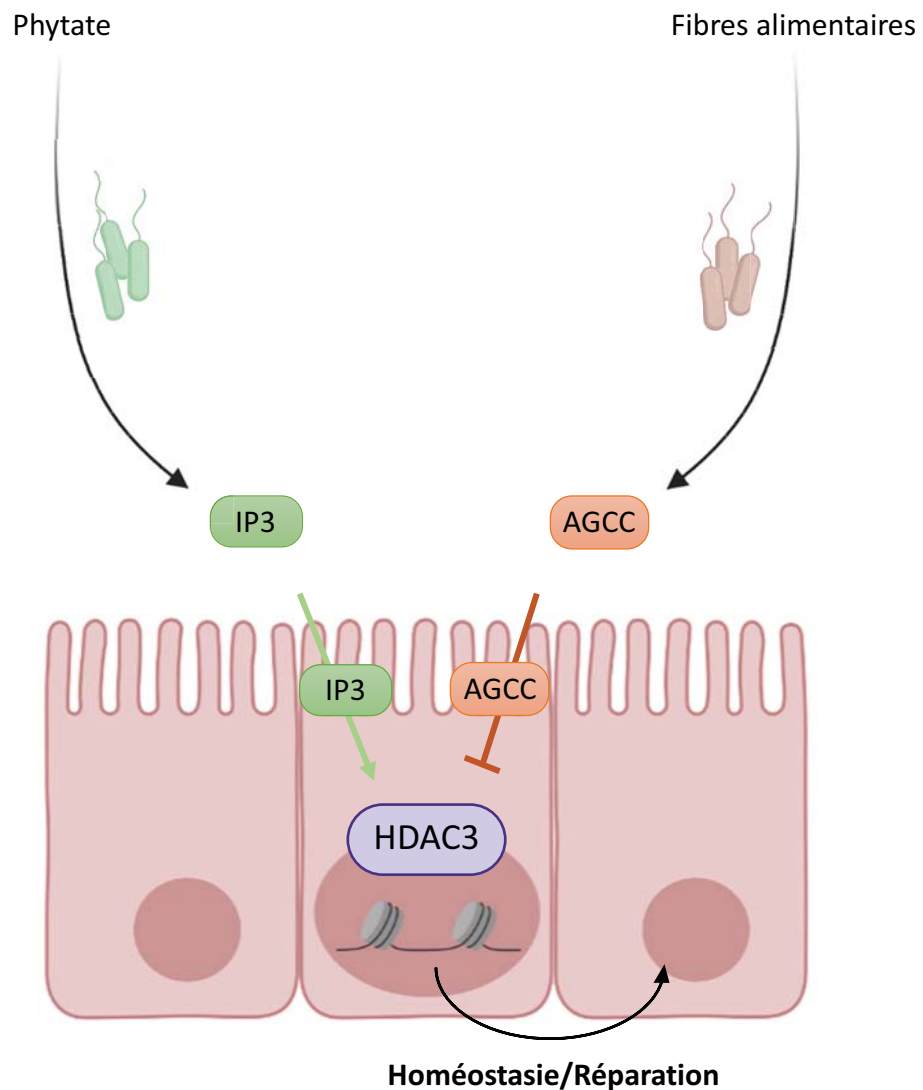
Les effets du microbiote intestinal sur les marques épigénétiques peuvent passer par la synthèse de métabolites spécifiques qu'il produit (**Figure 24**). Notamment, le microbiote intestinal est capable de dégrader les fibres alimentaires non digestibles ce qui va produire les AGCC, dont le rôle d'inhibiteurs de HDACs et leurs effets bénéfiques sur l'inflammation ont été déjà présentés dans ce manuscrit. Les AGCC synthétisés par le microbiote peuvent moduler la méthylation de l'ADN. Le butyrate induit

notamment la phosphorylation de ERK, résultant en l'inhibition de DNMT1 et en la déméthylation conséquente de gènes suppresseurs de tumeurs (Sarkar *et al.*, 2011). Il a été démontré que les niveaux d'expression réduits de l'adiponectine et de la résistine dans le tissu adipeux épидидymal de souris nourries avec un régime HF étaient significativement inversés par une supplémentation alimentaire en AGCC (acétate, propionate et butyrate seuls ou mélangés). La modification de l'expression était associée à une diminution de la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs de ces gènes chez les souris supplémentées en AGCC ainsi qu'à une diminution de l'expression et de la fixation de *DNMT1*, *DNMT3a* et *DNMT3b* et *MBD2* au niveau des promoteurs de l'adiponectine et de la résistine. Ces résultats démontrent que les AGCC pourraient corriger l'expression aberrante de certains gènes *via* des modulations de la méthylation de l'ADN (Y. Lu *et al.*, 2018). Une étude récente a également mis en évidence que le propionate pouvait induire l'hyperméthylation d'un locus particulier inhibant l'expression du gène cible *DABI* qui serait impliqué dans le développement du diabète (W. Guo *et al.*, 2022). Toutefois, le mécanisme sous-jacent n'a pas été identifié.

De nombreuses espèces de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* peuvent synthétiser du folate au niveau intestinal. Après absorption par l'intestin ou d'autres organes, le folate est catalysé en 5-méthyl tétrahydrofolate, qui est nécessaire pour la génération de SAM, le principal donneur de groupement méthyl pour les DNMTs et les HMTs (**Figure 3**). Sur cette base, le folate participe à la méthylation de l'ADN dans l'intestin et les autres organes (D'Aquila *et al.*, 2020; Paul *et al.*, 2015; J. Wu *et al.*, 2022). Il a notamment été montré que le folate permettait de maintenir une méthylation cellulaire adéquate pour réduire le risque de cancer colorectal et assurer un développement normal de l'intestin (Farias *et al.*, 2015; C.-Z. Huang *et al.*, 2015; Kok *et al.*, 2018, 2020). Ainsi, des modifications au niveau de la composition du microbiote peuvent influencer la disponibilité en SAM et ainsi modifier le statut de méthylation de l'ADN ou des histones chez l'hôte. Aussi, *Lactobacillus reuteri* produit une nouvelle forme de folate qui peut transférer 2 carbones sur l'homocystéine résultant en la synthèse d'un acide aminé non conventionnel, l'éthionine. Une analyse par spectrométrie de masse a révélé que les cellules THP-1 utilisaient l'éthionine en l'incorporant, au lieu de la méthionine, dans les protéines et que l'éthionine supprimait la méthylation des histones et menait à la formation d'une nouvelle modification post-traductionnelle des histones, l'éthylation. De plus, l'éthionine a un effet immunosuppresseur sur les macrophages THP-1 stimulées avec du LPS en bloquant l'activation de NF- $\kappa$ B et l'expression du TNF- $\alpha$  (Röth *et al.*, 2019).

## ii. Sur les modifications post-traductionnelles des histones

En plus de modifier l'acétylation des histones, les AGCC peuvent également impacter la crotonylation. En effet, il a été montré que la crotonylation des histones était réduite au niveau colique suite à un traitement des souris avec des antibiotiques, cet effet étant notamment dû à l'augmentation de l'expression de HDAC2 associée à une forte diminution de la concentration en butyrate (Fellows *et al.*,



**Figure 25 : Les métabolites dérivés du microbiote régulent HDAC3 au niveau intestinal.**

L'activité de HDAC3 est finement régulée par l'équilibre entre différents métabolites synthétisés par le microbiote intestinal, l'IP3, issu du métabolisme du phytate, et les AGCC, provenant de la dégradation des fibres alimentaires, ce qui lui permet de contrôler l'homéostasie intestinale (adaptée de Wu *et al.*, 2020).

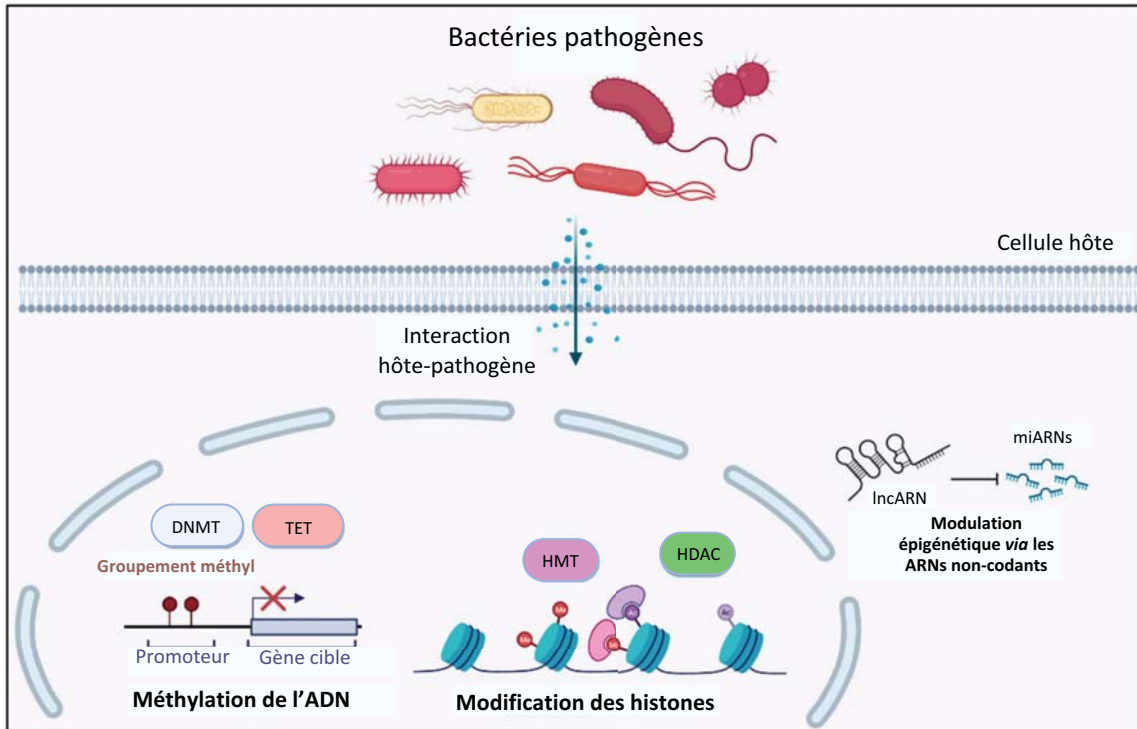
AGCC : Acides Gras à Chaînes Courtes, IP3 : Inositol triphosphate, HDAC : Histone désacétylase.

2018). Krautkramer et collaborateurs ont démontré que la régulation des modifications post-traductionnelles des histones par le microbiote était sensible au régime alimentaire. En effet, la consommation d'un régime occidentalisé enrichi en graisses, en plus d'induire des modifications de la composition du microbiote intestinal, limitait la production d'AGCC et supprimait les effets du microbiote sur l'état de la chromatine (Krautkramer *et al.*, 2016). De manière intéressante, ils ont montré qu'une supplémentation en AGCC chez des souris axéniques était suffisante pour reproduire les effets de la colonisation par le microbiote sur les modifications post-traductionnelles des histones. Ainsi, ces résultats suggèrent que la composition du microbiote intestinal et la production d'AGCC correspondante sont des facteurs importants et dépendants du régime alimentaire pour la régulation de l'épigénome, connectant le régime alimentaire, le microbiote et l'état de modification de la chromatine.

D'autres travaux ont montré que l'activité de HDAC3 était supérieure dans les CEIs de souris présentant un microbiote comparativement aux souris élevées en condition axénique. Ils ont démontré que cela était dû à la production d'inositol triphosphate issu de la dégradation du phytate par les bactéries commensales du microbiote, et notamment les *Escherichia coli* (S. Wu *et al.*, 2020). De plus, l'exposition intestinale à de l'inositol triphosphate ou l'ingestion de phytate favorisait la cicatrisation de l'épithélium suite à des dommages intestinaux. Ainsi, ces résultats confirment que HDAC3 est impliqué dans le maintien de l'homéostasie intestinale *via* sa régulation par des métabolites dérivés du microbiote (**Figure 25**).

D'autres métabolites produits par le microbiote intestinal peuvent impacter l'épigénome. Par exemple, il a été démontré, dans des lymphocytes T régulateurs, qu'un dérivé de l'acide lithocholique, un acide biliaire, augmentait significativement le recrutement de la HAT P300 et l'accumulation de H3K27ac au niveau de la région promotrice du gène *Foxp3*, favorisant son expression et la différenciation des lymphocytes T régulateurs (Hang *et al.*, 2019). Cela suggère que les acides biliaires participeraient au maintien de la fonction immune intestinale en modulation l'acétylation des histones. Aussi, il a été montré que l'acide gallique, un polyphénol, régula la marque H3K4me3 au niveau des promoteurs Wnt dans un modèle murin de cancer colorectal (Kadosh *et al.*, 2020).

L'ensemble des travaux présentés ici a démontré que le microbiote intestinal et les divers métabolites qu'il produit interagissaient avec l'épigénome de l'hôte, cette interaction jouant un rôle important dans le développement intestinal et son homéostasie. Toutefois, du fait de cette relation microbiote-métabolite-épigénome, il est désormais évident que des altérations de la composition du microbiote peuvent avoir des effets délétères sur l'homéostasie de l'hôte.



**Figure 26 : Modulations des marques épigénétiques par des bactéries pathogènes.**

Certaines bactéries ont la capacité de moduler les marques épigénétiques au sein des cellules hôtes que ce soit *via* la modulation de la méthylation de l'ADN ou *via* la modulation des modifications post-traductionnelles des histones. Cela va conduire au développement d'une tolérance immunitaire et à une diminution de la réponse immune contre les agents pathogènes (adaptée de Muhammad *et al.*, 2022).

DNMT : ADN méthyltransférase, HDAC : Histone désacétylase, HMT : Histone méthyltransférases, lncARN : ARN long non codant, TET : Ten-Eleven Translocation.



### III. Modulation des marques épigénétiques par des bactéries pathogènes

Comme cela a été mentionné précédemment, certaines bactéries commensales du microbiote peuvent induire des modifications épigénétiques (Rajeev *et al.*, 2021). Cependant, des bactéries pathogènes sont également capables de remodeler l'épigénome de l'hôte à leur avantage afin d'échapper au système immunitaire et de favoriser leur colonisation (**Figure 26**). Ainsi, cette partie se concentrera sur les altérations des marques épigénétiques induites par certaines bactéries pathogènes, et plus particulièrement sur la modulation de la méthylation de l'ADN et des marques histones induites suite à l'infection (M. Connor *et al.*, 2019; Dong & Hamon, 2020; Grabiec & Potempa, 2018; Qin *et al.*, 2021).

#### 1. Modulation de la méthylation de l'ADN par les bactéries

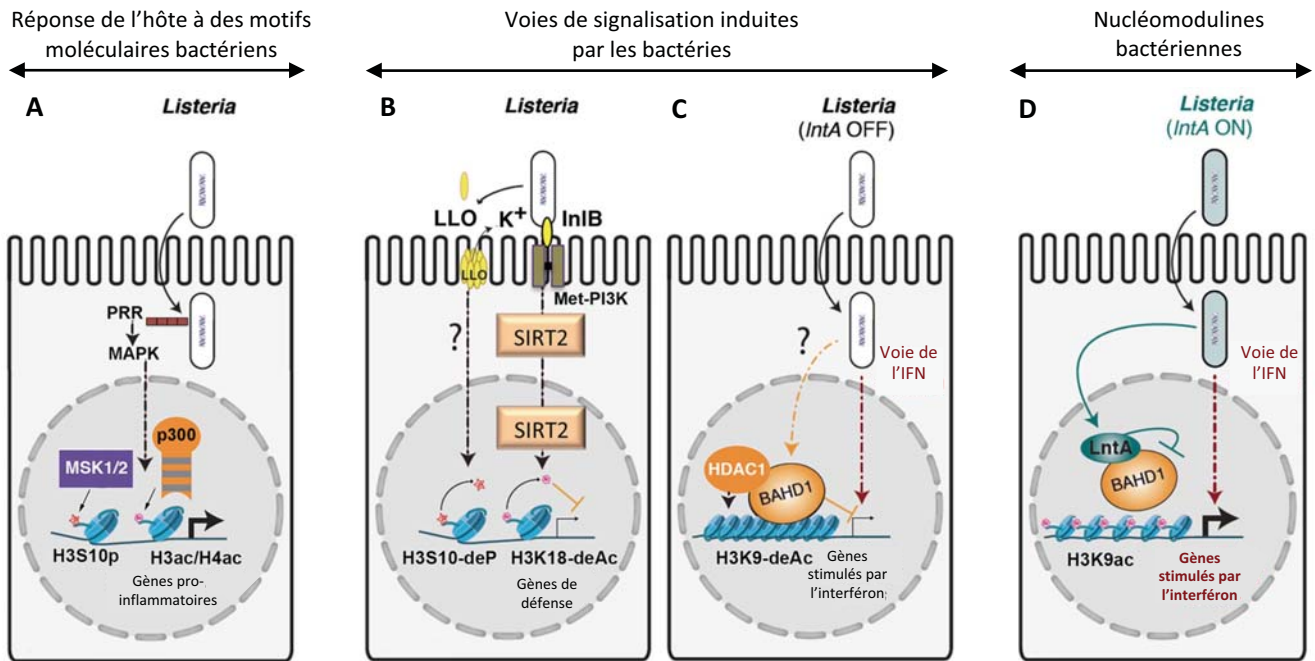
##### a. *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* est une bactérie à paroi Gram négative pathogène associée au développement du cancer gastrique. Plusieurs études ont montré des modifications au niveau de la méthylation de l'ADN dans la muqueuse gastrique de l'Homme suite à l'infection par *H. pylori* (Maekita *et al.*, 2006; Muhammad *et al.*, 2019; Pero *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2010, 2011; H. D. Woo *et al.*, 2018; Y. Zhang *et al.*, 2016). En effet, *H. pylori* induit une hyperméthylation de l'ADN au niveau d'îlots CpG localisés dans des régions promotrices des gènes. Les modifications de méthylation impactent de nombreux gènes comme des gènes suppresseurs de tumeurs, des gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN, la régulation du cycle cellulaire ou encore des gènes de l'inflammation, suggérant que l'accumulation de telles modifications épigénétiques dans la muqueuse gastrique infectée prédispose au développement de cancer de l'estomac (Muhammad *et al.*, 2019). De manière intéressante, il a été observé *in vivo* que le développement de cancer gastrique pouvait être limité en inhibant la méthylation de l'ADN induite par l'infection avec *H. pylori* (Niwa *et al.*, 2013). Une étude *in vitro* a montré une augmentation de l'expression de *DNMT1* et *DNMT3* dans des cellules gastriques en culture infectées avec *H. pylori*, suggérant un potentiel rôle de ces DNMTs dans l'hyperméthylation induite par l'infection (Yan *et al.*, 2011). Concernant les facteurs de virulence de *H. pylori*, l'îlot de pathogénicité *cag* code pour un système de sécrétion de type IV qui peut transférer des macromolécules telles que CagA à l'intérieur de la cellule hôte (Necchi *et al.*, 2019). Il a été démontré que l'infection de muqueuse gastrique de patients avec des souches de *H. pylori* exprimant CagA était significativement associée avec la méthylation du gène *MGMT* impliqué dans la réparation de l'ADN comparativement à l'infection avec des souches négatives pour CagA (Sepulveda *et al.*, 2010). Aussi, la surexpression *in vitro* de CagA diminuait l'expression de *PTEN* en augmentant le niveau de méthylation de son promoteur. Les mêmes modifications ont été observées dans des tissus de cancer gastrique exprimant CagA comparativement à des tissus dans lesquels CagA n'est pas exprimé, ce qui suggère que ce facteur de virulence serait impliqué dans l'hyperméthylation de l'ADN induite par *H. pylori* (B. Zhang *et al.*, 2019). Plusieurs îlots CpG ayant subi une méthylation de l'ADN restaient

méthylés même après l'élimination du pathogène, démontrant une persistance à long-terme des altérations épigénétiques induite par l'infection (Muhammad *et al.*, 2019; Niwa *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2010; H. D. Woo *et al.*, 2018; Y. Zhang *et al.*, 2016). Il a également été suggéré que l'inflammation causée par l'infection pouvait amplifier les modifications de méthylation de l'ADN (M. Maeda *et al.*, 2017; Muhammad *et al.*, 2019; Niwa *et al.*, 2010). Ainsi d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires conduisant à l'altération de la méthylation de l'ADN suite à l'infection par *H. pylori*.

### **b. *Mycobacterium tuberculosis***

Il est connu que l'infection par *Mycobacterium tuberculosis*, la bactérie responsable de la tuberculose chez l'Homme, résulte en des modifications de la méthylation de l'ADN *in vitro* et *in vivo* (Tarashi *et al.*, 2020). *In vitro*, des cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes infectées par *M. tuberculosis* présentaient une déméthylation de l'ADN au niveau d'« enhanceurs » régulant l'activation de facteurs de transcription immunitaires associée à une expression différentielle des gènes (Pacis *et al.*, 2015). Cette déméthylation était également associée à un gain de marques histones activatrices et à une accessibilité augmentée de la chromatine. Sharma et collaborateurs ont, quant à eux, montré que l'infection de macrophages THP-1 par *M. tuberculosis* résultait en une modification du profil de méthylation de l'ADN, la majorité des *loci* génomiques affectés étant hyperméthylés et les régions différenciellement méthylées étaient enrichies dans les gènes impliqués dans la réponse immunitaire et la réorganisation de la chromatine. De plus, il semblerait que la protéine bactérienne Rv2966c, qui a une activité ADN méthyltransférase, soit responsable des modifications de méthylation de l'ADN observées (G. Sharma *et al.*, 2015, 2016). Les macrophages isolés de patients infectés par *M. tuberculosis* montraient des profils de méthylation de l'ADN altérés au niveau des séquences promotrices de gènes codant pour des cytokines et leurs récepteurs (Zheng *et al.*, 2016). Aussi, dans des cellules mononuclées du sang issues de patients infectés par *M. tuberculosis*, une hyperméthylation de l'ADN dans des gènes impliqués dans la réponse immune a été détectée menant à une diminution de la réponse immunitaire caractérisée par une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires (DiNardo *et al.*, 2020). Il a également été observé une méthylation aberrante au niveau du promoteur du gène *TLR2*, régulant négativement l'expression de *TLR2*, dans les cellules NK et les monocytes de patients souffrant de tuberculose et corrélant avec la charge bactérienne et l'activité de la maladie (Y.-C. Chen *et al.*, 2014). Ainsi, ces résultats montrent que les altérations de la méthylation de l'ADN induite par l'infection par *M. tuberculosis* impactent négativement la réponse immune de l'hôte, favorisant l'infection de l'hôte par ce pathogène.



**Figure 27 : Mécanismes utilisés par *Listeria monocytogenes* pour cibler la chromatine et induire des modifications épigénétiques.**

La détection de *Listeria* par les récepteurs PRRs active la voie de signalisation MAPK menant à la phosphorylation de H3S10 par MSK1/2, l'acétylation des histones H3 et H4 par P300/CBP et à la transcription de gènes de l'inflammation (A). *Listeria* sécrète des effecteurs qui activent des voies de signalisation menant à la modification des histones. La toxine LLO induit la déphosphorylation de H3S10 via un efflux d'ions K<sup>+</sup> au niveau de la membrane plasmique. InlB active la voie c-Met-PI3K, favorisant la translocation de SIRT2 dans le noyau et la désacétylation de H3K18, ce qui conduit à une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la défense de l'hôte (B). Dans les cellules épithéliales, l'infection par *Listeria* induit des voies de signalisation dépendantes de l'interféron (IFN). Le complexe BAHD1/HDAC1 est recruté, via un mécanisme non connu, au niveau de gènes stimulés par l'interféron, ce qui induit la désacétylation de H3 et la répression de ces gènes (C). Quand *Listeria* exprime le gène *lntA*, la nucléomoduline LntA entre dans le noyau où elle se lie à BAHD1 et l'inhibe, restaurant l'acétylation de H3K9 et induisant l'expression des gènes stimulés par l'IFN (adaptée de Bierne and Hamon, 2020).  
 BAHD1 : Bromo Adjacent Homology Domain-containing 1, IFN : Interféron, InlB : Internaline B, LLO : Listériolysine, LntA : *Listeria* Nuclear Targeted protein A, MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase, MSK : Mitogen- and Stress-activated Kinase, PI3K : Phosphatidylinositol 3 kinase, PRR : Pattern Recognition Receptor, SIRT : Sirtuine.

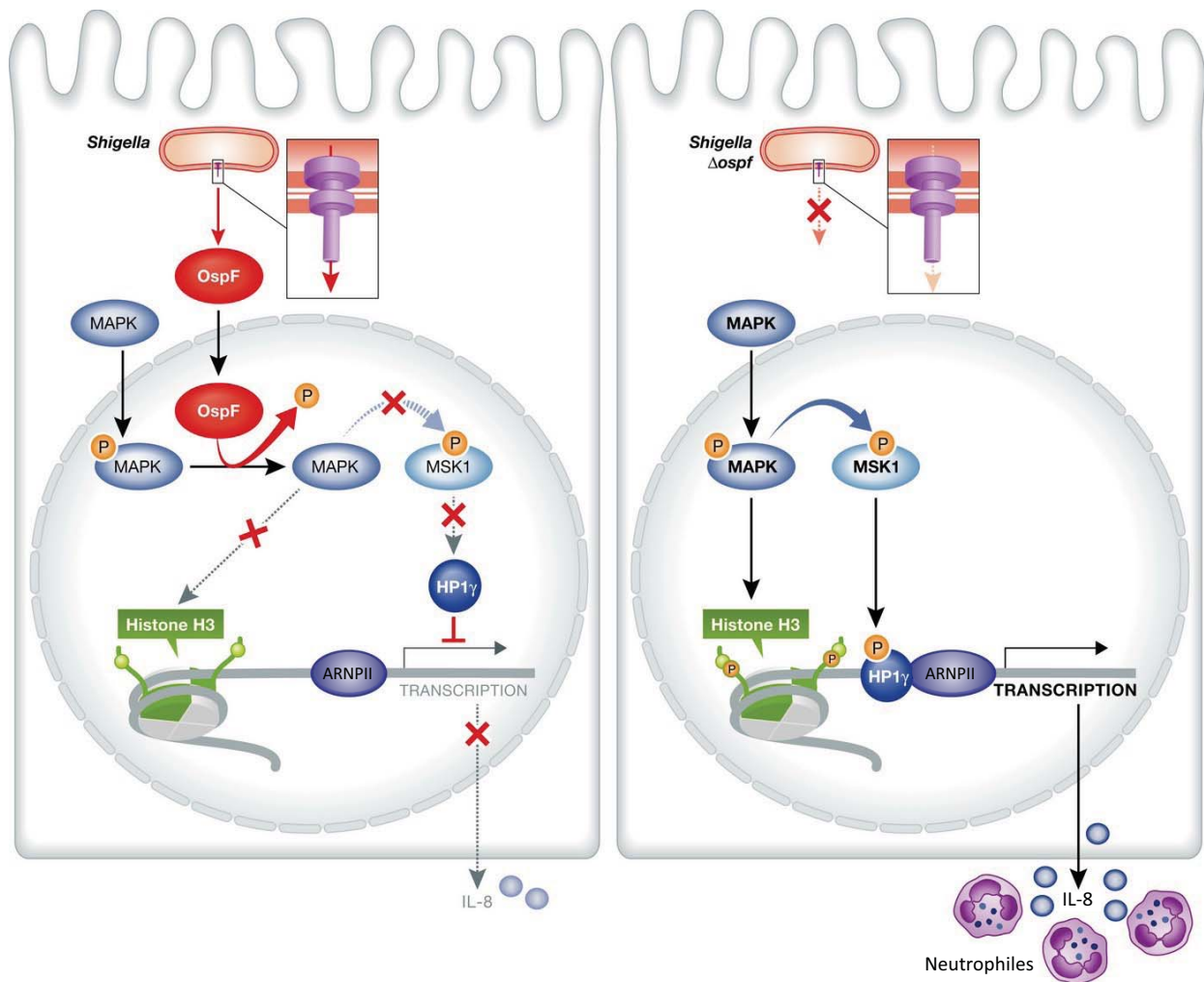
## 2. Modulation des marques histones par les bactéries

### a. *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes*, responsable de la listériose, possède une toxine, la listériolysine O (LLO) appartenant à la famille des cytolysines dépendantes du cholestérol, qui forme des pores dans la membrane des cellules. Il a été montré que la LLO induisait la déphosphorylation de H3S10 ainsi que la désacétylation de H4 dans des cellules épithéliales humaines, *via* un efflux d'ions K<sup>+</sup>. Ces modifications ont notamment été détectées au niveau du site d'initiation de la transcription de gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée, la désacétylation et la déphosphorylation menant à leur répression (**Figure 27A-B**) (Hamon *et al.*, 2007, 2012; Hamon & Cossart, 2011). Plus récemment, il a été observé que la LLO pouvait également induire la déphosphorylation de H3S10, nécessaire pour une infection efficace, *via* la déphosphorylation et l'activation consécutive de la protéine phosphatase PP1 (Dong *et al.*, 2020). De plus, *L. monocytogenes* produit une protéine de surface, InlB, qui interagit avec le récepteur cellulaire c-Met. Cette interaction induit l'internalisation de la bactérie et l'activation de la voie PI3K-Akt/PKB, ce qui va mener à la relocalisation de la désacétylase SIRT2 du cytoplasme vers le noyau. SIRT2 va alors s'associer à la chromatine au niveau des sites d'initiation de la transcription des gènes qu'elle régule et désacétyler H3K18, entraînant une répression des gènes et favorisant à terme l'invasion et la survie de la bactérie (**Figure 27B**) (Bierne & Cossart, 2002; Eskandarian *et al.*, 2013). Aussi, il a récemment été montré que SIRT2 interagissait avec la protéine TDP-43 pour son recrutement au niveau de la chromatine et que la désacétylation de H3K18 permettait de protéger les cellules des dommages à l'ADN induits par l'infection afin de favoriser la viabilité de la cellule hôte, permettant ainsi une infection plus efficace par *L. monocytogenes* (Eldridge & Hamon, 2021). Concernant la relocalisation de SIRT2, il a été observé que suite à l'infection, 2 phosphatases, PPM1A et PPM1B, déphosphorylaient et se complexaient avec SIRT2, permettant sa translocation dans le noyau (Pereira *et al.*, 2018). De plus, *L. monocytogenes* sécrète une nucléomoduline, LntA, qui agit au niveau nucléaire. BAHD1, associé avec HDAC1/2, réprime l'expression des gènes stimulés par l'interféron (ISGs) dans des cellules épithéliales infectées par *L. monocytogenes*. Quand la bactérie produit la nucléomoduline LntA, le recrutement de BAHD1-HDAC au niveau des promoteurs des ISGs est inhibé, entraînant l'acétylation de H3K9, l'ouverture de la chromatine et l'expression de ces gènes (**Figure 27C-D**) (Bierne & Hamon, 2020; Lebreton *et al.*, 2011). Ce processus est étroitement régulé par le pathogène, l'expression constitutive ou l'absence de LntA étant néfaste à l'infection. Ainsi, *Listeria monocytogenes* est capable de moduler l'épigénome de l'hôte à son avantage *via* différents mécanismes.

### b. *Shigella flexneri*

*Shigella flexneri* est une bactérie pathogène à paroi Gram négative qui provoque la dysenterie bacillaire chez l'Homme en envahissant les cellules épithéliales intestinales. Cette bactérie sécrète ses facteurs de virulence *via* le système de sécrétion de type III. Il a été démontré que l'un d'entre eux,



**Figure 28 : *Shigella* reprogramme la réponse transcriptionnelle de l'hôte en injectant l'effecteur OspF via le système de sécrétion de type 3.**

Une fois dans les cellules, l'effecteur OspF transloque dans le noyau où il déphosphoryle de manière irréversible MAPK, bloquant ainsi la phosphorylation de H3S10 et de HP1 $\gamma$ , ce qui va entraîner une répression transcriptionnelle de gènes de l'immunité spécifique comme l'*IL-8*. En l'absence d'OspF, l'infection par *Shigella* va activer MAPK, qui va induire la phosphorylation de H3S10 et HP1 $\gamma$ . Cela va favoriser la transcription et la production de l'*IL-8*, cette cytokine entraînant le recrutement de neutrophiles pour limiter et éliminer l'infection par *Shigella* (adaptée de Ashida and Sasakawa, 2014).

ARNPII : ARN polymérase II, HP1 $\gamma$  : Heterochromatin Protein 1 $\gamma$ , MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase, MSK : Mitogen- and Stress-activated Kinase.

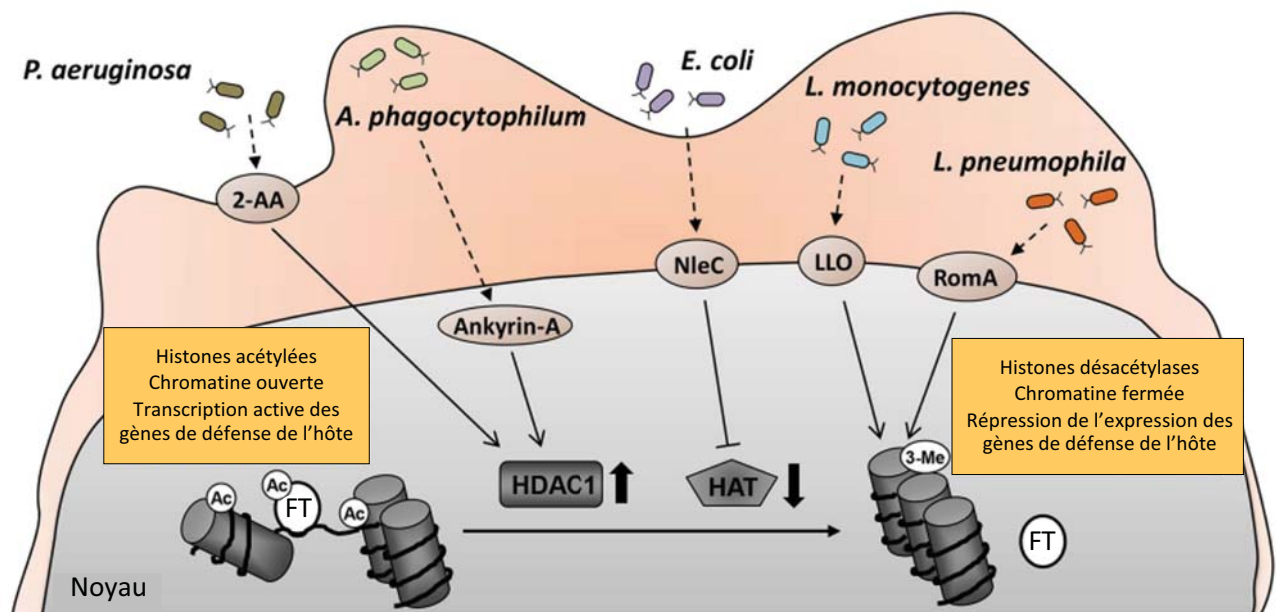


OspF, transloquait dans le noyau des cellules épithéliales, où grâce à son activité phosphothréonine lyase, il éliminait MAPK (modification chimique empêchant toute phosphorylation future de MAPK), l'inactivant ainsi de manière irréversible (Meijer *et al.*, 2017). Cette inactivation inhibait la phosphorylation de H3S10 au niveau de promoteurs de gènes de l'immunité innée comme l'*IL-8*, favorisant la condensation de la chromatine et inhibant la fixation de NF- $\kappa$ B et l'expression de gènes pro-inflammatoires (**Figure 28**) (Arbibe *et al.*, 2007; H. Li *et al.*, 2007). Conformément à cela, l'infection avec un mutant de *Shigella flexneri* n'exprimant plus OspF induisait une forte production d'*IL-8* et une altération de la muqueuse menant à une augmentation du recrutement de neutrophiles dans un modèle d'anses iléales chez le lapin (Arbibe *et al.*, 2007). Il a également été montré que OspF entraînait la déphosphorylation de la protéine « reader » de la chromatine HP1, *via* l'inactivation de la kinase MSK1, menant à la répression de la transcription de gènes de l'immunité comme l'*IL-8* (Harouz *et al.*, 2014). De plus, il a été révélé que la translocation nucléaire de OspF était notamment facilitée par sa SUMOylation au sein de la cellule hôte (Jo *et al.*, 2017). Les modifications de la chromatine et la répression de l'expression des gènes induites par OspF sont spécifiques et ciblent des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, montrant que *S. flexneri* reprogramme la réponse transcriptionnelle de l'hôte à son avantage.

### c. *Mycobacterium tuberculosis*

Plusieurs études ont montré que l'infection par *M. tuberculosis* entraînait des modifications au niveau des marques histones ou des HDACs (Tarashi *et al.*, 2020). L'infection de macrophages par *M. tuberculosis* résulte en une diminution de l'expression de gènes induits par l'interféron comme le transactivateur transcriptionnel CIITA qui régule le complexe majeur d'histocompatibilité. Cet effet passerait par l'augmentation du recrutement du complexe protéique Sin3 contenant des HDACs, menant à la désacétylation des histones, notamment au niveau des promoteurs des gènes CIITA, HLA-DR $\alpha$  et HLA-DR $\beta$  et à leur répression. La lipoprotéine de 19kDa de *M. tuberculosis* serait particulièrement impliquée dans ce mécanisme (Pennini *et al.*, 2006; Y. Wang *et al.*, 2005). *M. tuberculosis* sécrète également la protéine Rv1988 qui transloque dans le noyau de la cellule hôte et fonctionne comme une histone méthyltransférase ciblant spécifiquement H3R42. Il a été démontré que Rv1988 était nécessaire pour la virulence de *M. tuberculosis*. Cette protéine se lie sélectivement au niveau de régions promotrices où elle favorise la triméthylation de H3R42 et réprime l'expression des gènes impliqués dans la réponse immune comme les gènes régulant la production de ROS, favorisant la survie des bactéries dans les macrophages (Yaseen *et al.*, 2015). De plus, l'expression de Rv1988 est suffisante pour rendre virulente une souche non pathogène de *M. smegmatis* *in vitro* et *in vivo*, soulignant l'importance de cet effecteur. Une autre protéine effectrice de *M. tuberculosis* a été identifiée. Il s'agit de la protéine Rv3423.1 qui a une activité histone acétyltransférase et qui est capable d'acétyler l'histone H3 (Jose *et al.*, 2016). Toutefois, même si son expression favorise la réplication intracellulaire de la





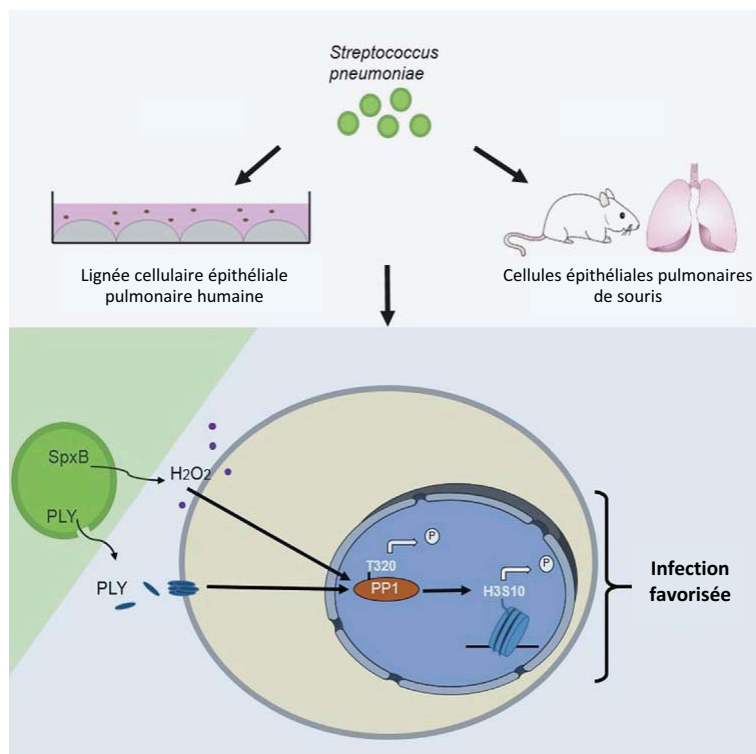
**Figure 29 : Modulation des marques histones lors d'une infection bactérienne.**

Les bactéries pathogènes ont développé différentes stratégies pour échapper au système immunitaire. *Pseudomonas aeruginosa* produit une molécule de *quorum sensing*, le 2-aminoacétophénone, qui induit la surexpression de HDAC1 dans les cellules hôtes. *Anaplasma phagocytophilum* induit également la surexpression de HDAC1 et produit l'ankyrin-A, qui *via* sa fixation à l'ADN, recrute HDAC1 au niveau des promoteurs des gènes. La molécule effectrice RomA produite par *Legionella pneumophila* bloque l'acétylation de H3K14 en induisant sa triméthylation. La métalloprotéase produite par les *Escherichia coli* entéropathogènes et entérohémorragiques dégrade la HAT de l'hôte P300 tandis que la LLO sécrétée par *Listeria monocytogenes* induit la déphosphorylation et la désacétylation des histones *via* un efflux d'ions K<sup>+</sup>. L'ensemble de ces modifications entraîne une hypoacétylation et une condensation de la chromatine qui se traduisent par une répression de l'expression des gènes de l'immunité (adaptée de Grabcic and Potempa, 2018).

souche non pathogène *M. smegmatis*, d'autres études sont nécessaires pour comprendre si les modifications induites modulent la réponse immune de l'hôte. Aussi, l'infection de macrophages dérivés de monocytes humains par *M. tuberculosis* diminue l'expression des HDACs de classe I et augmente l'expression de HDAC4 (Moore *et al.*, 2017). De plus, il a été observé que l'infection de macrophages par *M. tuberculosis* induisait l'expression et le recrutement de HDAC1 au niveau du promoteur d'*IL-12B* et que l'hypoacétylation consécutive de H3 supprimait l'expression de ce gène impliqué dans l'initiation de la réponse inflammatoire Th1 (Lymphocyte T helper 1). Aussi, le « silencing » de HDAC1 dans les macrophages limitait la survie intracellulaire des bactéries indiquant que les modifications épigénétiques induites par *M. tuberculosis* réduisent la réponse immune afin de favoriser la survie et la réplication de la bactérie chez l'hôte (Chandran *et al.*, 2015). Wang et collaborateurs ont montré que l'infection par *M. tuberculosis* entraînait une augmentation de l'expression de HDAC6 associée à une diminution de l'accumulation de HDAC11. HDAC6 était recrutée au niveau du promoteur de l'*IL-10*, ce qui induisait sa surexpression, et illustre la capacité de *M. tuberculosis* à atténuer la réponse immune de l'hôte (X. Wang, Wu, *et al.*, 2018). Dans une récente étude, il a été démontré que la phosphoribosyltransférase de *M. tuberculosis* (*MtbPRT*) induisait l'hyperméthylation de H3K9 et H3K27 au niveau des promoteurs des gènes *Atg5* et *Atg7* via l'activation de la méthyltransférase EHMT2/G9a et de la voie de signalisation P38-MAPK. Cela inhibait l'autophagie dans des macrophages, favorisant la survie intracellulaire des bactéries. De plus, *MtbPRT* entraînait la désacétylation de H3K9 et H3K27 via la surexpression de *HDAC3* (Sengupta *et al.*, 2021). Ainsi, *M. tuberculosis* est capable par différents effecteurs d'induire des modifications épigénétiques qui vont favoriser sa persistance et sa survie dans les cellules de l'hôte.

#### **d. *Legionella pneumophila***

La bactérie à paroi Gram négative *Legionella pneumophila* utilise le système de sécrétion de type IV (T4SS) pour injecter la protéine effectrice RomA, une méthyltransférase contenant un domaine SET. Une fois dans la cellule, RomA va agir au niveau nucléaire en induisant la triméthylation de H3K14 et en bloquant de manière consécutive l'acétylation de ce résidu ce qui entraîne le remplacement d'une marque activatrice par une marque répressive et donc une répression des gènes. Suite à l'infection de cellules THP-1, il a été observé que 4 870 régions promotrices étaient ciblées avec la marque H3K14me3 et réprimées, incluant des gènes de l'immunité innée comme des cytokines ou chémokines (**Figure 29**) (Rolando *et al.*, 2013). Ainsi, RomA reprogramme l'épigénome de l'hôte pour réprimer les gènes de défense et favoriser une réplication intracellulaire efficace. Aussi, une autre souche de *L. pneumophila* sécrète via son T4SS un effecteur similaire à RomA, LegAS4, qui possède également une activité méthyltransférase grâce à son domaine SET. Il a été observé que LegAS4, qui catalyse particulièrement la méthylation de H3K4, interagissait avec la protéine HP1 $\alpha/\gamma$  lui permettant de cibler la chromatine au



**Figure 30 : Modulation de la phosphorylation de H3S10 par *Streptococcus pneumoniae*.**

L'infection par *Streptococcus pneumoniae* induit la déphosphorylation de H3S10 dans les cellules épithéliales pulmonaires *via* 2 effecteurs bactériens, la pneumolysine PLY et la pyruvate oxydase SpxB qui produit de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. PLY et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vont activer la phosphatase PP1 qui est responsable de la déphosphorylation de H3S10, permettant une infection efficace (adaptée de Dong *et al.*, 2020).

niveau des promoteurs et régions intergéniques des gènes codant pour les ARN ribosomaux et d'activer leur transcription (T. Li *et al.*, 2013).

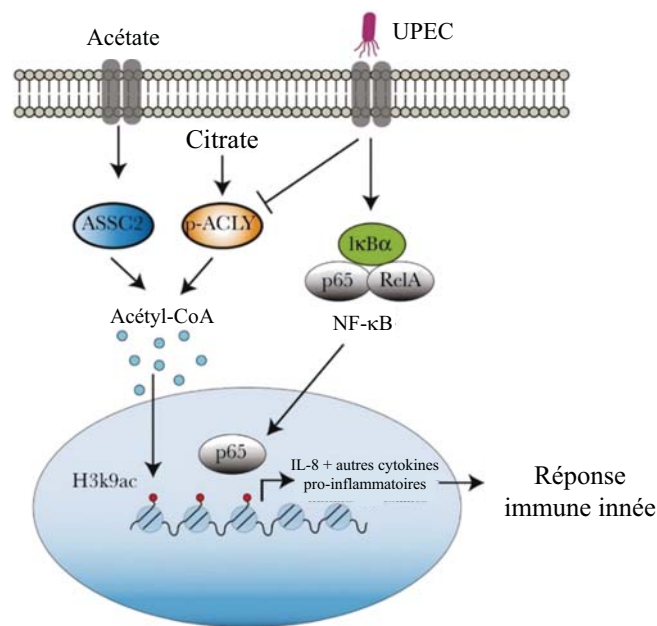
### e. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie à paroi Gram négative, libère une molécule de *quorum sensing*, le 2-aminoacétophénone (2-AA). Il a été observé que le pré-traitement de cellules THP-1 ou de souris infectées avec le 2-AA diminuait l'activité des HATs tandis qu'il augmentait celle des HDACs. Plus spécifiquement, le pré-traitement induisait l'accumulation de HDAC1 résultant en une désacétylation de H3K18 au niveau des promoteurs de gènes pro-inflammatoires, tels que le *TNF- $\alpha$* , *in vitro* et *in vivo* (Bandyopadhaya *et al.*, 2016). De manière intéressante, l'inhibition de HDAC1 bloquaient les effets immunomodulateurs induits par le 2-AA, démontrant son rôle crucial dans ce mécanisme. Ainsi, le 2-AA régule l'épigénome de l'hôte ce qui atténue la réponse immune et permet à la bactérie de persister. Dans une autre étude, l'infection par *Pseudomonas aeruginosa* induisait la déphosphorylation et la désacétylation de H3 d'une manière dépendante du système de sécrétion de type III. Ces modifications étaient dues à l'insertion du translocon PopB-PopD dans la membrane de la cellule hôte, créant un pore dans la membrane, qui persiste après le départ de la bactérie. Cela entraîne un efflux d'ion K<sup>+</sup> responsable des modifications des histones, de manière similaire à ce qui a été observé avec la LLO de *Listeria* (Dortet *et al.*, 2018). Ce résultat suggère que la déphosphorylation de H3 pourrait représenter une réponse universelle de l'hôte suite à un dommage au niveau de la membrane plasmique induit par des bactéries.

### f. Autres bactéries modulant les marques histones

La bactérie intracellulaire à paroi Gram négative *Anaplasma phagocytophylum* est également capable de moduler HDAC1 à son avantage. En effet, il a été démontré que l'infection de cellules THP-1 par *A. phagocytophylum* entraînait une surexpression de HDAC1 augmentant l'activité HDAC globale. De plus, la molécule effectrice ankyrin-A produite par la bactérie recrute HDAC1 au niveau des promoteurs de gènes de défense de l'hôte, ce qui entraîne une désacétylation de l'histone H3 et l'inhibition de l'expression des gènes de l'immunité, favorisant la survie de la bactérie dans les cellules hôtes (**Figure 29**) (Garcia-Garcia, Barat, *et al.*, 2009; Garcia-Garcia, Rennoll-Bankert, *et al.*, 2009; Rennoll-Bankert *et al.*, 2015).

*Streptococcus pneumoniae* est une bactérie extracellulaire à paroi Gram positive. Il a été montré que l'infection de cellules épithéliales respiratoires avec *S. pneumoniae* résultait en une déphosphorylation de H3S10, nécessaire pour une infection efficace. D'un point de vue mécanistique, la production de la toxine pneumolysine (PLY) et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par *S. pneumoniae* induit la déphosphorylation et l'activation consécutive de la phosphatase PP1, cette enzyme étant responsable de la déphosphorylation de H3S10 (**Figure 30**) (Dong *et al.*, 2020). *S. pneumoniae* entraîne également un



**Figure 31 : Effets de l'infection par les *Escherichia coli* uropathogènes (UPEC) sur l'acétylation des histones.**

L'infection par les UPEC active la voie de signalisation NF- $\kappa$ B afin d'initier la réponse immunitaire innée. Cependant, simultanément, l'infection inhibe l'enzyme ACLY *via* la diminution de sa phosphorylation, limitant la production cellulaire d'acétyl-CoA. Cela entraîne une diminution du niveau d'acétylation de H3K9 et entrave la fixation de p65 au niveau de promoteurs de gènes de l'inflammation tels que l'*IL-8*. Ce mécanisme permet aux UPEC de réduire la réponse immunitaire innée de l'hôte. Une supplémentation en acétate peut contrecarrer la diminution de l'expression des gènes de l'inflammation induite par les UPEC en augmentant le niveau d'acétyl-CoA et en rétablissant l'acétylation de H3K9 (adaptée de Zhang *et al.*, 2021).

ASSC2 : Acyl-CoA Synthase Short-Chain family member 2, ACLY : ATP-citrate lyase, I $\kappa$ B $\alpha$  : inhibiteur de  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor- $\kappa$ B, UPEC : *Escherichia coli* uropathogènes.

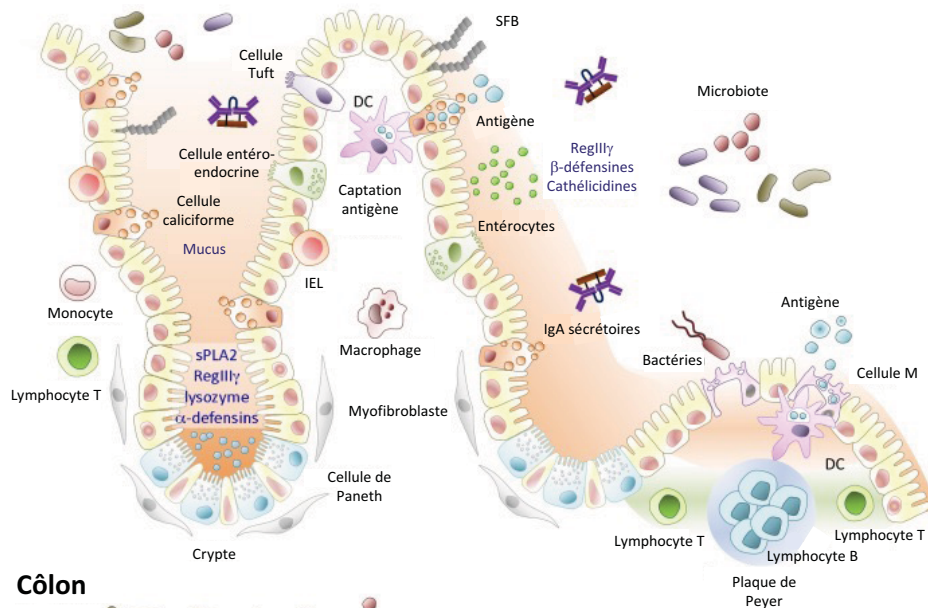
remodelage de la chromatine dans un modèle de cellules épithéliales de manière dépendante de l'histone déméthylase KDM6B, permettant de réguler la réponse de l'hôte à l'infection (M. G. Connor *et al.*, 2021). Aussi, l'infection de macrophages avec *S. pneumoniae* induit des changements globaux au niveau des modifications post-traductionnelles des histones, ces modifications étant dépendantes de PLY et associées avec une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire tels que TNF- $\alpha$  et IL-6 (Cole *et al.*, 2021). De plus, l'inhibition des HDACs avec du SAHA permettait de reproduire l'inhibition de TNF- $\alpha$ , suggérant que les effets de PLY passeraient par la régulation de l'acétylation des histones.

Les *Escherichia coli* entéro-pathogènes et entéro-hémorragiques, quant à elles, sécrètent la protéine effectrice NleC *via* leur système de sécrétion de type III. NleC est une métalloprotéase dégradant la HAT P300 dans les cellules infectées, menant à une diminution de la production d'IL-8, un effet qui peut être restauré avec la surexpression de P300 (**Figure 29**) (Shames *et al.*, 2011). Aussi, il a été observé que l'infection par des *E. coli* uropathogènes (UPEC) induisait une inhibition hémolysine-dépendante de l'enzyme ACLY, responsable de la production d'acétyl-CoA, résultant en une diminution des niveaux d'acétyl-CoA intracellulaires et en une désacétylation aberrante des histones. Cela entraînait une diminution de la fixation de NF- $\kappa$ B au niveau des promoteurs de gènes codant pour des cytokines et chémokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-8. De manière intéressante, ces effets étaient améliorés *in vitro* et *in vivo* par une supplémentation en acétate (**Figure 31**) (Z. Zhang *et al.*, 2021).

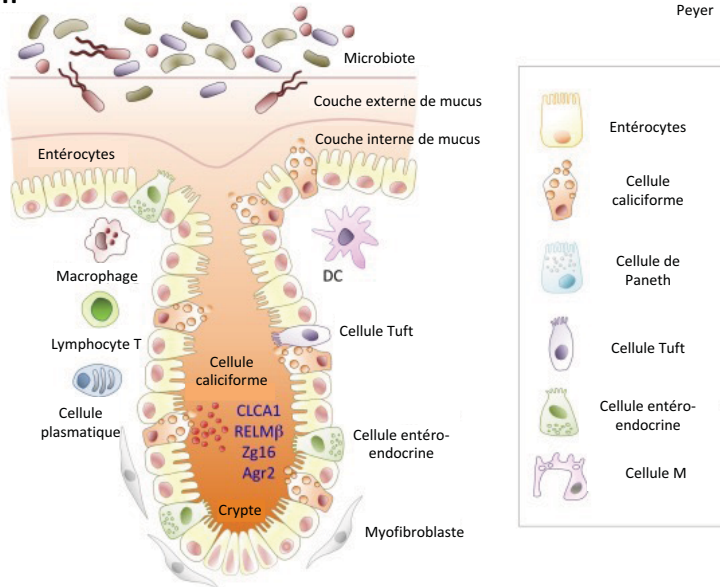
Les bactéries pathogènes utilisent différents mécanismes pour moduler l'épigénome de l'hôte que ce soit *via* la formation de pores, *via* la production de molécules effectrices modulant des cascades de signalisation ou régulant l'expression/l'activité d'acteurs épigénétiques de l'hôte ou encore *via* la production d'effecteurs bactériens capables d'induire eux-mêmes des modifications post-traductionnelles des histones. Ces modulations épigénétiques leur permettent notamment d'échapper au système immunitaire et favorise le processus d'infection. Toutefois, d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires induisant ces effets. Ces observations suggèrent également qu'il serait intéressant d'étudier le lien entre épigénétique et bactéries dans d'autres contextes comme dans des maladies multifactorielles, où des facteurs microbiens entrent en jeu à l'instar de la maladie de Crohn.



## Intestin grêle



## Côlon



**Figure 32 : Anatomie de la muqueuse intestinale.**

**A : Épithélium de l'intestin grêle.** Les entérocytes sont les principales cellules retrouvées dans l'axe crypte-villosité et sont capables de sécréter des peptides antimicrobiens (RegIIIγ, β-défensines, cathélicidines), tout comme les cellules de Paneth (lysozyme, α-défensines, sPLA2), présentes à la base des cryptes. Les cellules M sont localisées au niveau de l'épithélium associé au follicule recouvrant les plaques de Peyer et participent à la capture et au passage des antigènes vers les cellules immunitaires sous-jacentes.

**B : Épithélium colique.** Les entérocytes et les cellules caliciformes sont les cellules majoritaires des cryptes coliques. Les cellules caliciformes sont responsables de la production des couches de mucus (adaptée de Allaire *et al.*, 2018).

DC : Cellule dendritique, IEL : Lymphocyte intra-épithélial, SFB : Segmented Filamentous Bacteria

## Troisième partie :

### La maladie de Crohn

---

#### I. La barrière intestinale

##### 1. Structure et fonctions de la barrière intestinale

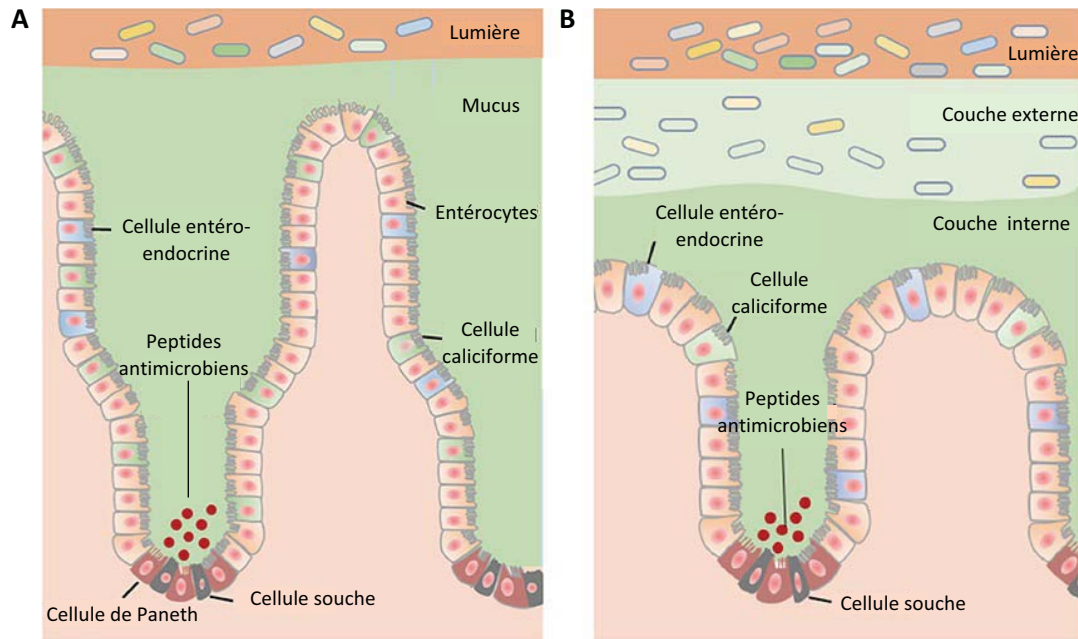
L'épithélium intestinal est une barrière interactive et dynamique qui permet de limiter l'accès des micro-organismes aux tissus de l'hôte. Cet épithélium est composé d'entérocytes responsables de la fonction d'absorption de l'intestin, de cellules caliciformes sécrétant le mucus, des cellules de Paneth sécrétant des peptides antimicrobiens, des cellules M responsables du passage d'antigènes de la lumière intestinale vers les cellules immunitaires sous-jacentes ou bien encore des cellules Tuft qui produisent des médiateurs immunitaires et des cellules entéro-endocrines qui produisent des hormones digestives (Allaire *et al.*, 2018). Les cellules épithéliales forment une monocouche de cellules polarisées reposant sur la *lamina propria* via leur pôle basolatéral. L'épithélium est organisé en villosités permettant d'augmenter la surface de contact entre l'intestin et la lumière intestinale et en cryptes de Lieberkühn, où l'on retrouve les cellules souches intestinales assurant le renouvellement des cellules de l'épithélium et, en fonction du segment intestinal, les cellules de Paneth (**Figure 32**).

L'épithélium digestif constitue une barrière intestinale protectrice. En effet, la muqueuse intestinale est constamment exposée à des antigènes, qu'ils soient d'origine alimentaire ou bactériens, susceptibles d'induire des réactions allergiques.

Cette barrière intestinale est à la fois physique, grâce à la cohésion des cellules épithéliales et à leurs interactions avec le tissu conjonctif sous-jacent, chimique, grâce à la sécrétion de mucus et de substances défensives et protectrices contre de potentiels micro-organismes pathogènes telles que les peptides antimicrobiens, et immunitaire grâce à la participation de cellules épithéliales à l'immunité innée et à leurs interactions avec le système lymphoïde associé au tube digestif, et à la sécrétion d'immunoglobulines (Ig) A.

Brièvement, le mucus est produit de façon continue par les cellules caliciformes présentes au sein de l'épithélium intestinal et est principalement composé d'eau et de glycoprotéines ramifiées, les mucines, MUC2 étant la mucine principale. L'intestin grêle est recouvert d'une fine couche de mucus concentrant les peptides antimicrobiens et les IgA, ce qui permet de maintenir les bactéries à distance de l'épithélium. Deux couches de mucus sont présentes au niveau du côlon distal, une première couche interne adhérente et généralement stérile et une seconde couche externe peu adhérente et hébergeant des bactéries commensales (**Figure 33**) (Herath *et al.*, 2020).

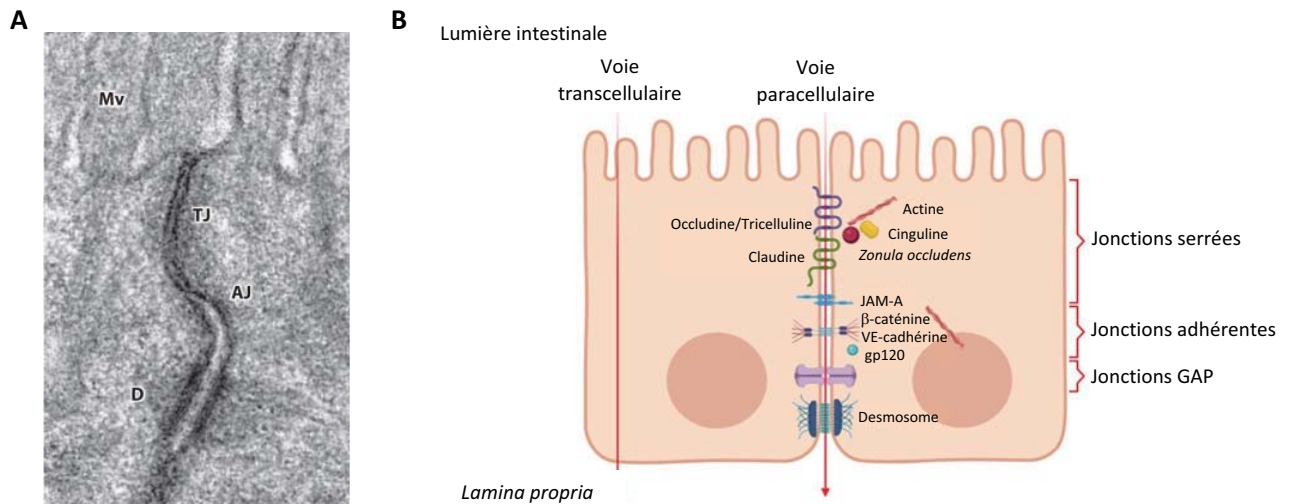
Les IgA sécrétoires sont produites par les plasmocytes en réponse à des antigènes alimentaires ou microbiens. Elles participent à la défense de l'épithélium en neutralisant des toxines ou en se fixant à des bactéries ce qui permet leur rétention dans la lumière intestinale, limitant leur accès à l'épithélium



**Figure 33 : Structure de la couche de mucus en fonction de la localisation.**

**A : Intestin grêle.** L'intestin grêle contient une seule couche de mucus, lâchement associée à l'épithélium et facilement pénétrable. Les bactéries présentes dans la lumière intestinale sont principalement repoussées de la surface de l'épithélium par des peptides antimicrobiens.

**B : Côlon.** On retrouve 2 couches de mucus au niveau du côlon distal : une couche de mucus interne adhérente et une couche de mucus externe faiblement attachée. La couche interne est généralement stérile tandis que la couche externe abrite une partie du microbiote intestinal (adaptée de Herath *et al.*, 2020).



**Figure 34 : Le complexe apical de jonction de l'épithélium intestinal.**

**A : Image de microscopie électronique à transmission.** Les jonctions serrées (TJ) sont sous les microvillosités (Mv) suivies par les jonctions adhérentes (AJ). Les desmosomes (D) sont localisées vers le pôle basolatéral (adaptée de Shen *et al.*, 2011).

**B : Représentation schématique du complexe apical de jonction.** Les molécules peuvent traverser la monocouche de cellules épithéliales intestinales *via* l'espace intercellulaire (voie paracellulaire) ou à travers les cellules (voie transcellulaire). Le complexe de jonction impliqué dans la voie paracellulaire inclut les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les jonctions GAP et les desmosomes. Les jonctions serrées sont constituées de protéines transmembranaires comme les claudines, l'occludine, les protéines JAM et *Zonula occludens* (ZO). Les protéines ZO sont des protéines d'échafaudage intracellulaires connectant les protéines claudines, occludine et JAM au cytosquelette d'actine. Le schéma n'est pas représentatif de la répartition des jonctions, la ceinture des jonctions serrées, des jonctions adhérentes et le premier desmosome sont en réalité situés dans les premiers micromètres sous la bordure en brosse (adaptée de Barbara *et al.*, 2021).

et favorisant leur élimination. Les IgA sécrétoires peuvent aussi immobiliser des bactéries en ciblant leurs flagelles ou en modulant l'expression de gènes bactériens *via* le ciblage de protéines de surface (Pietrzak *et al.*, 2020).

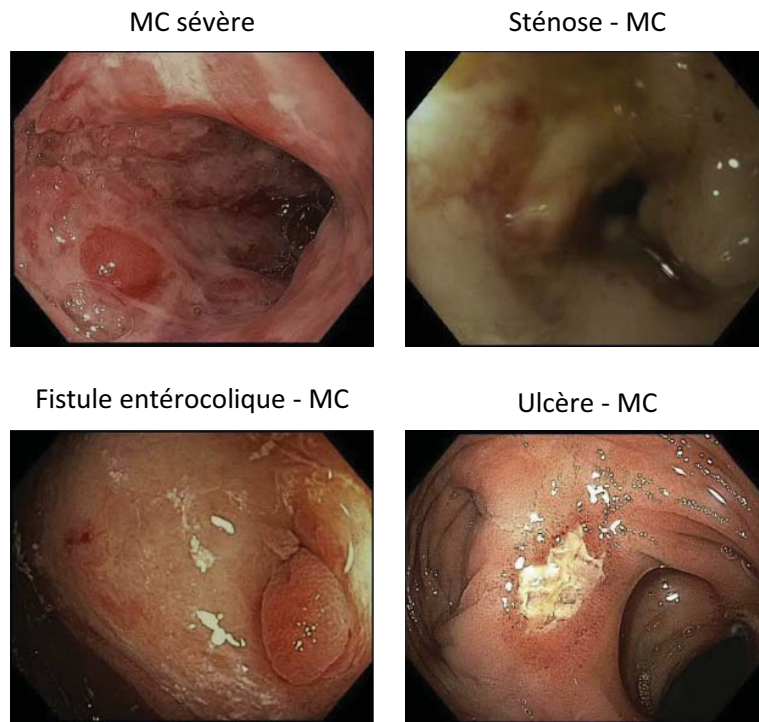
Les peptides antimicrobiens sont majoritairement sécrétés par les cellules de Paneth et les entérocytes mais les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes de la *lamina propria* peuvent également synthétiser ces peptides. Les trois principaux types de peptides antimicrobiens retrouvés au niveau intestinal incluent les défensines, qui créent des pores dans les membranes des bactéries, les cathélicidines, qui perturbent également la membrane cellulaire des bactéries et Reg3 $\alpha/\beta/\gamma$  (« Regenerating islet-derived protein 3  $\alpha/\beta/\gamma$  »), des lectines solubles interagissant avec des composants de la surface bactérienne (X. Zong *et al.*, 2020). Ces peptides antimicrobiens peuvent être exprimés de manière constitutive comme la  $\beta$ -défensine ou en réponse à des stimuli bactériens *via* l'activation des récepteurs Toll-like, comme Reg3 $\gamma$ .

Le système immunitaire intestinal est important pour la tolérance vis-à-vis du microbiote intestinal. Différentes cellules immunitaires sont présentes au niveau de la *lamina propria* comme des macrophages assurant la phagocytose et l'élimination des bactéries, ou des cellules dendritiques qui coordonnent la réponse immunitaire adaptative *via* la présentation d'antigènes. Les plaques de Peyer sont des organes lymphoïdes secondaires impliquées dans l'échantillonnage d'antigènes *via* les cellules M pour la présentation au système immunitaire sous-jacent (Cerf-Bensussan & Gaboriau-Routhiau, 2010; Mörbe *et al.*, 2021).

## 2. Intégrité de l'épithélium intestinal

La barrière physique formée par l'épithélium intestinal doit être efficace pour limiter le passage des micro-organismes et des antigènes de la lumière intestinale vers la sous-muqueuse. Cependant, elle doit également être perméable à l'eau et aux ions pour permettre des échanges entre milieu extérieur et intérieur. Ainsi, les jonctions serrées, en régulant finement la perméabilité intestinale paracellulaire, sont les déterminants majeurs de la barrière intestinale physique. On trouve également les jonctions adhérentes et les desmosomes sous les jonctions serrées, qui régulent aussi la perméabilité paracellulaire.

Les jonctions serrées constituent un réseau de protéines situées à l'apex de la membrane latérale des cellules épithéliales comprenant principalement les protéines transmembranaires claudines, occludine et JAM (« Junctional Adhesion Molecules ») ainsi que des protéines d'échafaudage intracellulaires telles que ZO (*Zonula occludens*) (**Figure 34**) (Barbara *et al.*, 2021; Peterson & Artis, 2014; J. R. Turner, 2009). Brièvement, ZO-1, ZO-2 et ZO-3 sont des protéines d'échafaudage cytoplasmique permettant de lier les jonctions serrées avec le cytosquelette, ZO-1 interagissant notamment avec les claudines, l'occludine et les protéines JAM. Il existe 2 classes de claudines fonctionnellement différentes au niveau intestinal : les claudines « barrier-forming » responsables de l'étanchéité et les claudines « pore-forming » formant des pores entre les cellules de l'épithélium



**Figure 35 : Lésions endoscopiques de la maladie de Crohn.**

Principales lésions et complications observables lors d'un examen endoscopique chez des patients atteints de la maladie de Crohn (MC) (d'après Klinger and Kann, 2019).



intestinal. Par exemple, les claudines-1, -3, -4, -5, -7, -8, -11, -14, -18 et -19 font parties des claudines « barrier-forming » tandis que les claudines-2, -10a/-10b, -15, -16 et -17 font parties de claudines formant des pores (Barbara *et al.*, 2021; Günzel & Yu, 2013). L'occludine est une protéine transmembranaire dont le domaine carboxy-terminal cytoplasmique contient le site de fixation pour ZO-1. C'est aussi une protéine dont la phosphorylation est corrélée avec la localisation des jonctions serrées. Les protéines transmembranaires JAM appartiennent à la famille des immunoglobulines, elles interagissent avec ZO-1 *via* leur domaine C-terminal, JAM-A étant la plus caractérisée pour la régulation de la fonction barrière des jonctions serrées.

Il est important de noter que les cytokines pro-inflammatoires, incluant le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IFN- $\gamma$ , entraînent une augmentation de la perméabilité intestinale *via* la dérégulation des jonctions serrées permettant la pénétration d'antigène luminaux dans le tissu sous-jacent et favorisant donc l'inflammation (R. Al-Sadi *et al.*, 2009, 2016; R. M. Al-Sadi & Ma, 2007; Bruewer *et al.*, 2003; S. H. Lee, 2015; T. Y. Ma *et al.*, 2005). *A contrario*, l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, a un rôle protecteur, maintenant la fonction barrière (Albert-Bayo *et al.*, 2019; Oshima *et al.*, 2001).

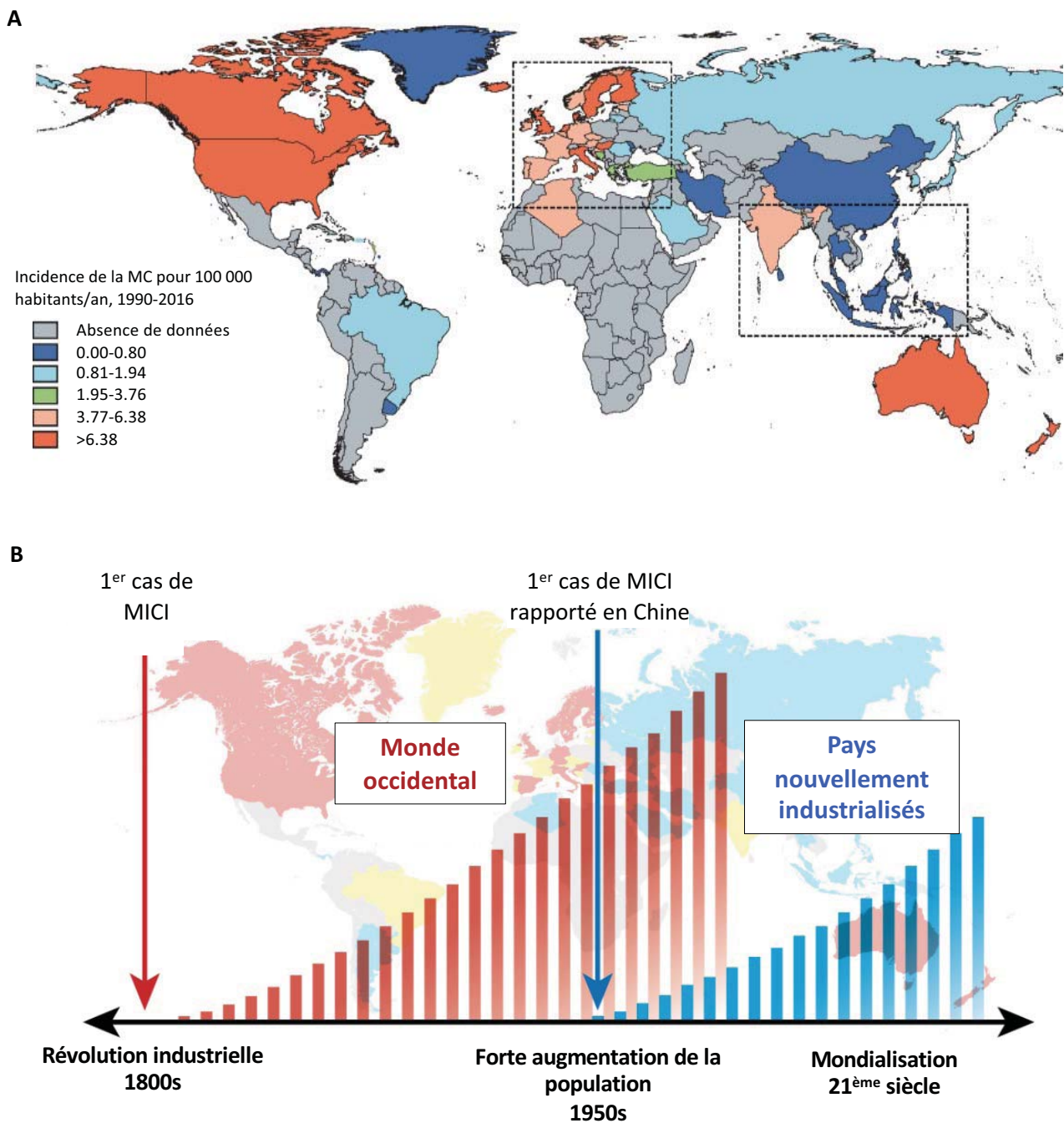
## II. Généralités sur la maladie de Crohn

### 1. Définition et épidémiologie

La maladie de Crohn (MC) fait partie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), au même titre que la rectocolite hémorragique (RCH). La MC, décrite pour la première fois par le médecin Burrill B. Crohn, évolue par poussées inflammatoires entrecoupées de périodes de rémission cliniques (Crohn *et al.*, 1932). Elle se caractérise par des lésions intestinales segmentaires, discontinues (respectant des zones de muqueuses intestinales saines) et transmuraux qui peuvent atteindre l'ensemble du tractus digestif, avec une atteinte préférentielle de l'iléon terminal et du côlon (**Figure 35**) (35-45% des cas) (Torres *et al.*, 2017; Roda *et al.*, 2020). La MC se déclare le plus souvent chez le jeune adulte (20-30 ans) avec un plus petit pic d'incidence observé chez les personnes de 50-60 ans et sans qu'il n'y ait de distribution sexe-spécifique. De plus, les patients atteints de MC colique présentent un risque plus élevé de développer un cancer colorectal que les sujets sains (Olén *et al.*, 2020; Stidham & Higgins, 2018).

Affectant davantage les pays développés au 20<sup>ème</sup> siècle, la maladie de Crohn est maintenant une maladie mondiale, bien que l'incidence et la prévalence de la MC soient inégales en fonction des zones géographiques. La prévalence est supérieure dans les pays à mode de vie occidental comparativement aux pays en voie de développement. Les plus fortes prévalences de la maladie entre 1990 et 2016 ont notamment été observées en Europe du Nord (Allemagne : 322 cas pour 100 000 habitants) et en Amérique du Nord (Canada : 319 cas pour 100 000) (Ng *et al.*, 2017). Concernant l'incidence, les pays d'Amérique du Nord, d'Europe et l'Australie présentent la plus forte incidence pour 100 000 habitants sur la période 1990-2016 (**Figure 36A**) (Ng *et al.*, 2017). Toutefois, même si





**Figure 36 : Incidence de la maladie de Crohn (MC) et des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MCI) dans le monde.**

**A : Incidence de la MC dans le monde.** L'incidence est indiquée en nombre de cas pour 100 000 habitants et par an. L'incidence est la plus élevée dans les pays d'Amérique du Nord, d'Europe et en Australie. L'incidence est en augmentation depuis quelques années dans les pays nouvellement industrialisés d'Asie et d'Amérique du Sud (adaptée de Ng *et al.*, 2017).

**B : Évolution de l'incidence des MCI dans le monde au cours du temps.** L'incidence des MCI dans les pays occidentalisés a connu une forte augmentation durant le 20<sup>ème</sup> siècle. Toutefois, même si ce n'est pas représenté, l'incidence est actuellement stable voire en baisse dans ces pays, contrairement à ce que l'on peut observer dans les pays nouvellement industrialisés, où l'incidence est en forte augmentation au cours du 21<sup>ème</sup> siècle (adaptée de Kaplan and Ng, 2017).

l'incidence est plus élevée dans ces pays industrialisés à mode de vie occidental, elle est stable voir en baisse tandis qu'elle est en augmentation dans les pays nouvellement industrialisés d'Afrique, d'Asie, et d'Amérique du Sud, faisant craindre une forte augmentation de la prévalence de la maladie dans ces pays dans les prochaines années (**Figure 36B**). Selon le registre français EPIMAD, l'incidence de la MC a augmenté de 30% entre 1988 et 2008. Le nombre de personnes atteints de MC s'élèverait à 200 000 en France et 2,5 millions en Europe.

## 2. Physiopathologie de la MC

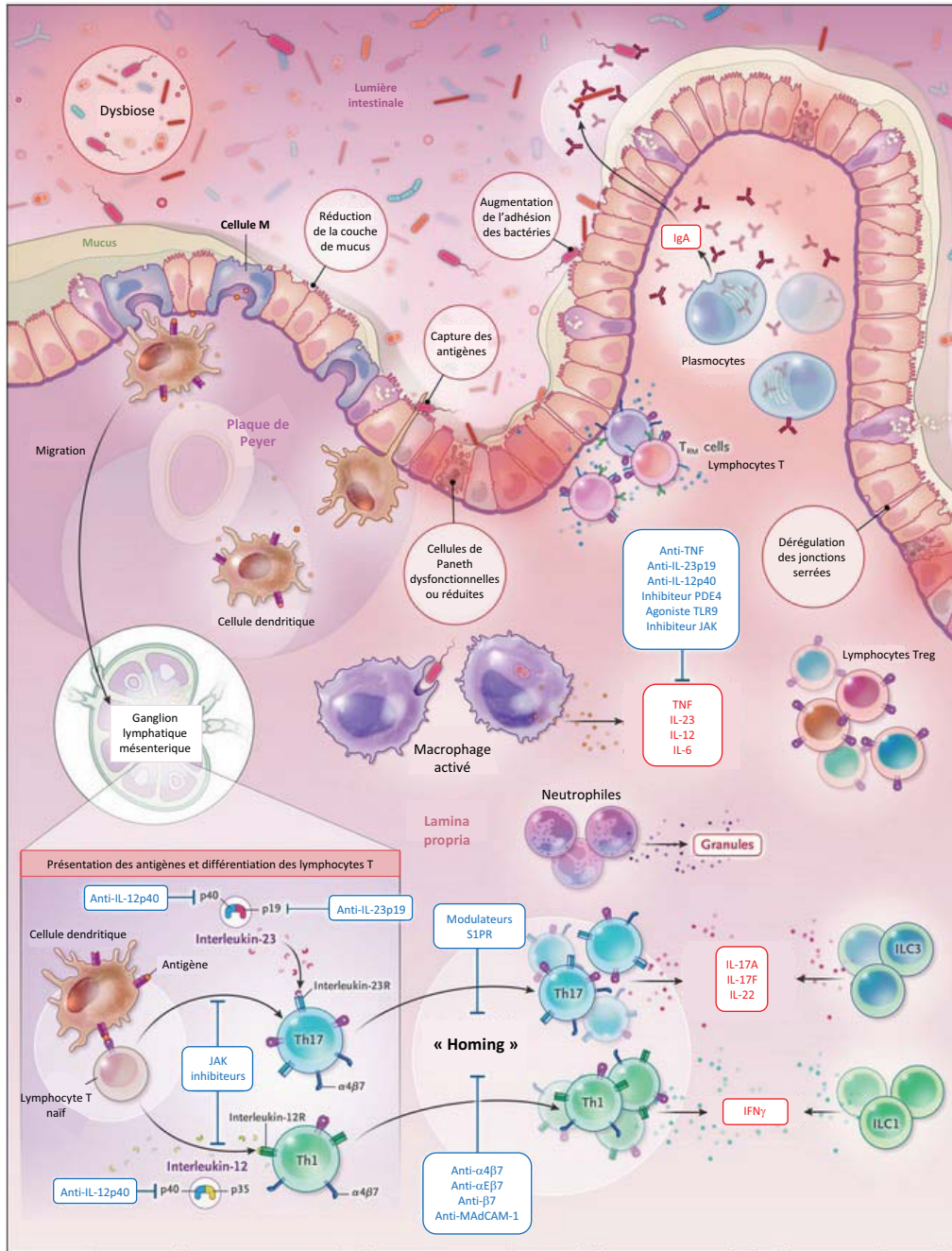
### a. Perméabilité intestinale et MC

De nombreuses études ont montré une augmentation de la perméabilité intestinale chez les patients atteints de MC en phase active de la maladie ainsi qu'une restauration de cette perméabilité au cours des phases de rémission (Adenis *et al.*, 1992; J. Benjamin *et al.*, 2008; Hollander *et al.*, 1986; Jenkins *et al.*, 1987, 1988; Sanderson *et al.*, 1987; Vivinus-Nébot *et al.*, 2014; Wyatt *et al.*, 1997). Un traitement à base d'anticorps anti-TNF- $\alpha$  est capable de normaliser la perméabilité intestinale chez les patients renforçant l'impact négatif de cette cytokine pro-inflammatoire dans la MC (Suenart *et al.*, 2002; Zeissig *et al.*, 2004). Une corrélation entre l'augmentation de la perméabilité intestinale et le risque de rechute a également été observé indiquant que l'augmentation de la perméabilité intestinale jouerait un rôle sur la progression de la maladie et serait prédictive des rechutes (Arnott *et al.*, 2000; D'Inca *et al.*, 1999; Hilsden *et al.*, 1999; Wyatt *et al.*, 1993).

Plusieurs études ont noté une augmentation de la perméabilité intestinale chez des parents du premier degré de patients atteints de MC, qui était associée avec un développement ultérieur de la MC. Cette association restait significative même quand le test de perméabilité intestinale était réalisé 3 ans avant le déclenchement de la MC (Buhner, 2006; Fries *et al.*, 2005; Hollander *et al.*, 1986; Irvine & Marshall, 2000; Turpin *et al.*, 2020). Ces résultats suggèrent donc qu'une altération de la barrière intestinale précéderait le développement de la MC et participerait à la pathogenèse de la maladie.

D'un point de vue mécanistique, des analyses en microscopie électronique à transmission ont révélé une structure anormale des jonctions serrées chez les patients atteints de MC (Zeissig *et al.*, 2007). De plus, une diminution de l'expression de l'occludine et des claudines « barrier-forming » -5 et -8 associée à une augmentation de l'expression de la claudine « pore-forming » claudine-2 ont été observées chez des patients atteints de MC en phase active (Zeissig *et al.*, 2007). Une diminution de l'expression de JAM-A et de ZO-1 au niveau des cellules épithéliales de patients atteints de MC a également été décrite (Vetrano *et al.*, 2008; Vivinus-Nébot *et al.*, 2014).

L'augmentation de la perméabilité intestinale favorise la translocation bactérienne de la lumière intestinale vers la *lamina propria* entraînant une stimulation anormale du système immunitaire sous-jacent. Une étude récente a montré qu'une augmentation des IgG systémiques spécifiques de bactéries commensales était observée suite à la translocation de bactéries chez la souris et l'Homme et qu'il était



**Figure 37 : Le système immunitaire intestinal associé à la muqueuse dans le contexte de la MC.**

Dans le contexte de la MC, il est observé une altération de la couche de mucus, des altérations au niveau des jonctions serrées, des cellules de Paneth ou encore une augmentation de la perméabilité intestinale, tout cela résultant en une augmentation de l'exposition de la *lamina propria* aux antigènes luminaux. Les macrophages activés par les antigènes luminaux vont produire davantage de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF, l'IL-23, l'IL-12 ou l'IL-6 favorisant l'inflammation. Les cellules dendritiques vont rester dans les plaques de Peyer ou migrer au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques, où elles pourront présenter les antigènes aux lymphocytes T naïfs. Une fois différenciés et de retour dans la muqueuse, les lymphocytes Th1 et Th17 vont produire d'autres cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IFN $\gamma$  pour les Th1 ou de l'IL-17A/F et de l'IL-22 pour les Th17. Les ILC1 et ILC3 sont également augmentés chez les patients.

Les stratégies thérapeutiques utilisées ou en cours d'investigation sont représentées en bleu. Par exemple, il peut s'agir de molécules neutralisant des cytokines pro-inflammatoires ou des cytokines contrôlant la différenciation des lymphocytes T, des molécules inhibant la transduction du signal ou des molécules bloquant le trafic des lymphocytes (adaptée de Chang, 2020).

ILC : Cellule lymphoïde innée; Th : Lymphocyte T auxiliaire.

possible d'identifier les bactéries ayant transloquées *via* l'analyse du répertoire d'IgG (Vujkovic-Cvijin *et al.*, 2022). De manière intéressante, il a été observé que le profil de IgG dirigés contre le microbiote était différent chez les patients atteints de MC comparativement aux contrôles avec notamment une réponse systémique IgG accrue contre plusieurs genres bactériens, dont *Bifidobacterium*, *Collinsella*, *Faecalibacterium* et *Blautia*, ce qui suggère une translocation préférentielle de ces genres chez les patients.

### **b. Dérégulations de la réponse immunitaire**

La MC est caractérisée par une inflammation intestinale chronique qui serait la conséquence d'une dérégulation de la réponse immunitaire innée et adaptative au niveau de la muqueuse intestinale (Roda *et al.*, 2020; Torres *et al.*, 2017). L'augmentation de la perméabilité intestinale dans le contexte de la MC permet l'entrée d'antigènes de la lumière intestinale vers la *lamina propria* déclenchant une réponse immunitaire exacerbée (**Figure 37**).

Au niveau de l'immunité innée, les neutrophiles peuvent phagocyter les microorganismes pathogènes pour maintenir l'homéostasie mais leur accumulation au sein de l'épithélium intestinal peut altérer la fonction barrière et mener à la production de médiateurs pro-inflammatoires qui vont entretenir l'inflammation intestinale (de Souza & Fiocchi, 2016). Aussi, chez les patients atteints de MC, il a été observé une augmentation de l'expression de *TLR2* et *TLR4*, qui sont des récepteurs de l'immunité innée capables de reconnaître des molécules bactériennes, et de molécules de co-stimulation au sein des cellules dendritiques, ce qui contribue à l'inflammation intestinale *via* l'induction de la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-18 (Hart *et al.*, 2005; Middel *et al.*, 2006). Une augmentation du nombre de macrophages, notamment des macrophages M1 pro-inflammatoires, au niveau de la muqueuse intestinale a été rapportée chez les patients atteints de MC, ces macrophages sécrétant des cytokines pro-inflammatoires, IL-6, IL-23 et TNF, suite à leur stimulation (Chapuy *et al.*, 2019; Demetter *et al.*, 2005; Franzè *et al.*, 2013; Kamada *et al.*, 2008). Les cellules lymphoïdes innées (ILCs) sont également impliquées dans la pathogenèse de la MC. En effet, davantage d'ILCs 1 et 3 sont retrouvés au niveau des iléons et côlons enflammés de patients atteints de MC (Geremia & Arancibia-Cárcamo, 2017). Aussi, les ILCs 1 sont plus abondants dans l'iléon de patients atteints de MC comparativement aux patients sans inflammation iléale (Geremia *et al.*, 2011). La libération de cytokines solubles et d'autres médiateurs de l'inflammation contribuent à l'état inflammatoire et au recrutement d'autres cellules immunitaires responsables de lésions tissulaires.

La MC est caractérisée par une réponse Th1 et Th17 excessive vis-à-vis de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, IL-18 et IL-23 produites par les cellules dendritiques et les macrophages. En réponse à cela, les lymphocytes Th1 et Th17 vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17, IFN- $\gamma$  et TNF, qui vont maintenir l'inflammation (Ahluwalia *et al.*,



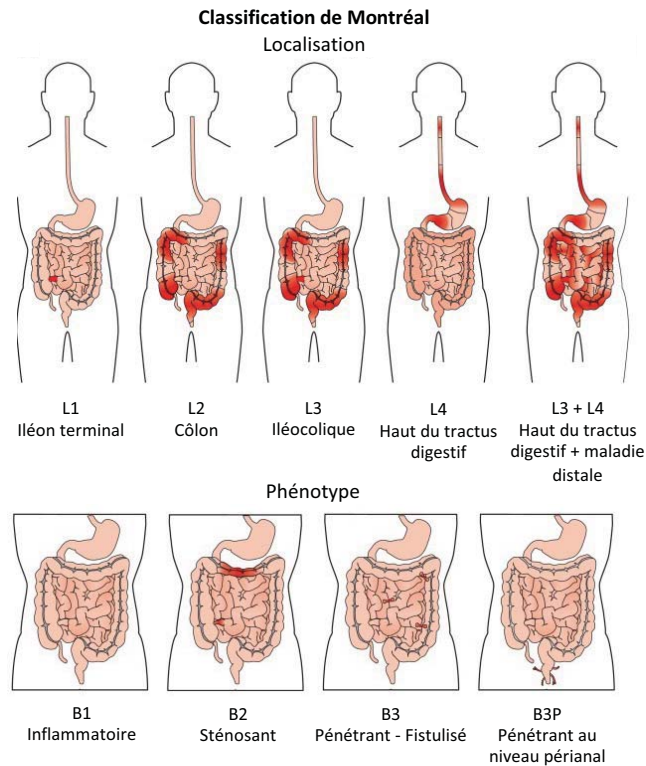
**Table 1 : Classification de Montréal.**

La classification de Montréal catégorise les patients selon leur âge au moment du diagnostic, la localisation de la maladie, et son phénotype, ces variables constituant des informations pronostiques importantes (d'après Satsangi *et al.*, 2006).

L4 : modificateur qui peut être ajouté à la classification L1-L3 quand il y a une atteinte du tractus digestif haut.

P : modificateur qui peut être ajouté à la classification B1-B3 en cas de présence d'atteinte périanale.

Classification de Montréal	
<b>Âge au moment du diagnostic</b>	
<16 ans	A1
17-40 ans	A2
>40 ans	A3
<b>Localisation de la maladie</b>	
Iléon	L1
Côlon	L2
Iléocolique	L3
Haut du tractus digestif	L4
<b>Phénotype de la maladie</b>	
Inflammatoire	B1
Sténosant	B2
Pénétrant – Fistulisé	B3
Atteinte périanale	P



**Figure 38 : Localisations et phénotypes de la maladie de Crohn selon la classification de Montréal.**

La MC touche préférentiellement l'iléon terminal et le côlon (L3) dans 35-45% des cas (adaptée de Baumgart and Sandborn, 2012).

2018; Uhlig & Powrie, 2018). De plus, un contrôle insuffisant par les lymphocytes T régulateurs (Treg), qui ont une fonction suppressive, est également associé à la pathogenèse de la MC. Ce serait la dérégulation du rapport lymphocytes effecteurs/Treg plutôt que le nombre absolu de Treg qui jouerait un rôle dans la dérégulation de la réponse inflammatoire (Ahluwalia *et al.*, 2018).

### 3. Diagnostic de la maladie de Crohn

Le diagnostic de la MC est difficile car aucun test ne permet à lui seul de l'établir. Le diagnostic repose ainsi sur l'observation de manifestations cliniques ainsi que sur l'identification et la caractérisation de lésions intestinales par des examens endoscopiques, radiologiques et anatomo-pathologiques. Une fois la MC diagnostiquée et les atteintes/lésions caractérisées, la classification de Montréal est utilisée pour distinguer les malades en fonction de la localisation de la maladie et de son phénotype (**Table 1** et **Figure 38**).

#### a. Symptômes et signes cliniques

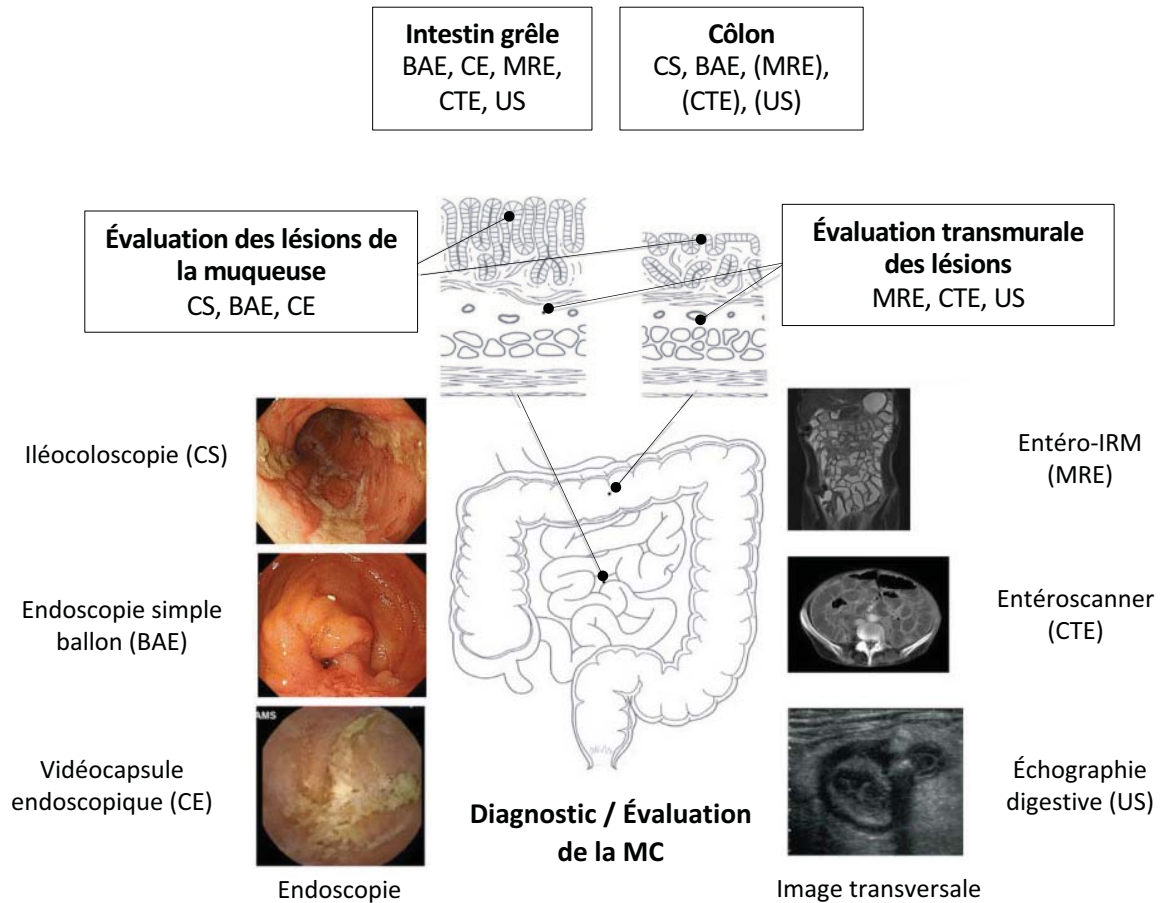
Les symptômes de la MC, peu spécifiques, dépendent de la localisation, de la sévérité et du phénotype de la maladie. Les symptômes les plus fréquents sont des douleurs abdominales (quadrant inférieur droit), une diarrhée chronique, de la fatigue, une perte de poids, de la fièvre et de l'anémie. Des fistules ou des ulcères/fissures périanaux sont également observables. Les patients avec une atteinte colique peuvent également présenter des rectorragies ainsi qu'une diarrhée glairo-sanglante (Roda *et al.*, 2020). De plus, des manifestations extra-intestinales sont observées chez 43% des patients (Vavricka *et al.*, 2011). Ces atteintes peuvent être oculaires, dermatologiques, vasculaires, respiratoires, hépatobiliaires, inflammatoires ou encore de l'arthropathie.

#### b. Examens endoscopiques et radiologiques

L'examen de référence pour le diagnostic de la MC est l'iléocoloscopie avec biopsie. Elle permet la détection de lésions inflammatoires qui sont réparties inégalement avec des intervalles de muqueuse saine au niveau de l'iléon ou du côlon. Ces lésions peuvent être des érosions aphteuses ou des ulcères plus ou moins profonds. L'examen endoscopique permet également d'évaluer le pronostic, la réponse au traitement ou de surveiller l'apparition d'une éventuelle dysplasie. Dans le cas où l'iléocoloscopie s'avère normale mais qu'une MC est toujours soupçonnée, la vidéocapsule endoscopique ou l'endoscopie simple ballon est mise en place afin de détecter des lésions qui seraient présentes plus haut dans le tractus digestif, au niveau de l'intestin grêle (**Figure 39**) (Pennazio *et al.*, 2015; Roda *et al.*, 2020). L'endoscopie simple ballon permet également de mieux caractériser les lésions au niveau de l'intestin grêle (Takenaka *et al.*, 2020).

Afin d'évaluer au mieux l'étendue des lésions, de détecter d'éventuelles complications (sténose, fistule ou abcès), ou d'évaluer la réponse aux traitements, des examens d'imagerie complémentaires sont réalisés. Il s'agit de l'entéroscanner, l'entéro-IRM et de l'échographie digestive (**Figure 39**). Même





**Figure 39 : Examens endoscopiques et radiologiques utilisés pour diagnostiquer la maladie de Crohn.**

L'examen de référence pour le diagnostic de la MC est l'endoscopie. L'endoscopie simple ballon et la vidéocapsule endoscopique sont utilisées pour la détection de lésions au niveau de l'intestin grêle. Les méthodes d'imagerie sont complémentaires des examens endoscopiques, que ce soit pour le diagnostic ou pour évaluer la réponse aux traitements (adaptée de Takenaka *et al.*, 2020).

si l'échographie digestive n'a pas recours à des radiations et qu'il s'agit d'un examen non-invasif et peu coûteux, l'entéroscanner et l'entéro-IRM, du fait de leur plus haute sensibilité et spécificité sont les plus utilisées (Takenaka *et al.*, 2020).

### **c. Analyse histologique**

À partir de la biopsie réalisée lors de l'endoscopie, un examen histologique est effectué afin de confirmer le diagnostic de la MC ou de réaliser un diagnostic différentiel. L'observation d'inflammation focale, d'une distorsion discontinue des cryptes intestinales, d'une architecture irrégulière des villosités intestinales de l'iléon ou de granulome épithélioïde permet de confirmer la maladie, le granulome épithélioïde étant la lésion histologique la plus significative pour confirmer le diagnostic d'une MC (Roda *et al.*, 2020; K. Turner *et al.*, 2014).

La présence de « creeping fat » est aussi une caractéristique de la MC. Il s'agit d'une extension du tissu adipeux viscéral, métaboliquement active, recouvrant les intestins et qui joue un rôle important de la régulation de l'inflammation intestinale (R. Mao *et al.*, 2019).

### **d. Biomarqueurs**

Des biomarqueurs sériques ou fécaux, plus ou moins spécifiques de la MC, sont utilisés pour suivre l'activité et la progression de la maladie. La protéine C réactive (CRP) est un biomarqueur sérique de l'inflammation aiguë non spécifique du tractus digestif. Même si elle peut être utilisée pour évaluer l'activité de la maladie, un tiers des patients ne présente pas d'élévation de la CRP, même en cas de poussées inflammatoires et la corrélation entre le taux de CRP et l'activité endoscopique observée chez les patients est modérée et variable selon les études (P. Chen *et al.*, 2020; Mosli *et al.*, 2015; Solem *et al.*, 2005). Des anticorps peuvent également être utilisés pour affiner la fiabilité du diagnostic et différencier MC et RCH. Les anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCAs) sont des anticorps de type IgA ou IgG reconnaissant des résidus mannoses présents au niveau de la paroi de la levure *S. cerevisiae*, d'autres micro-organismes ou au niveau de protéines de l'hôte. Cependant, l'implication de *S. cerevisiae* dans l'induction de la synthèse de ces anticorps n'a pas été clairement démontrée. La prévalence des ASCAs est de 60-70% chez les patients atteints de MC, 10-15% chez les patients souffrant de RCH et de moins de 5% chez les sujets négatifs pour une MICI (Mitsuyama *et al.*, 2016). Les auto-anticorps pANCAs (« Perinuclear Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies ») reconnaissent des antigènes présents dans le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles. Les pANCAs sont détectés dans 10-15% des cas de MC, 60-70% des cas de RCH et moins de 5% dans la population contrôle (Mitsuyama *et al.*, 2016).

La calprotectine fécale est une protéine formée par un hétérocomplexe des protéines S100A8 et S100A9, produite par les polynucléaires neutrophiles et sécrétée en cas d'inflammation intestinale. Il a été démontré que le taux de calprotectine fécale corrélait avec l'activité de la maladie évaluée par

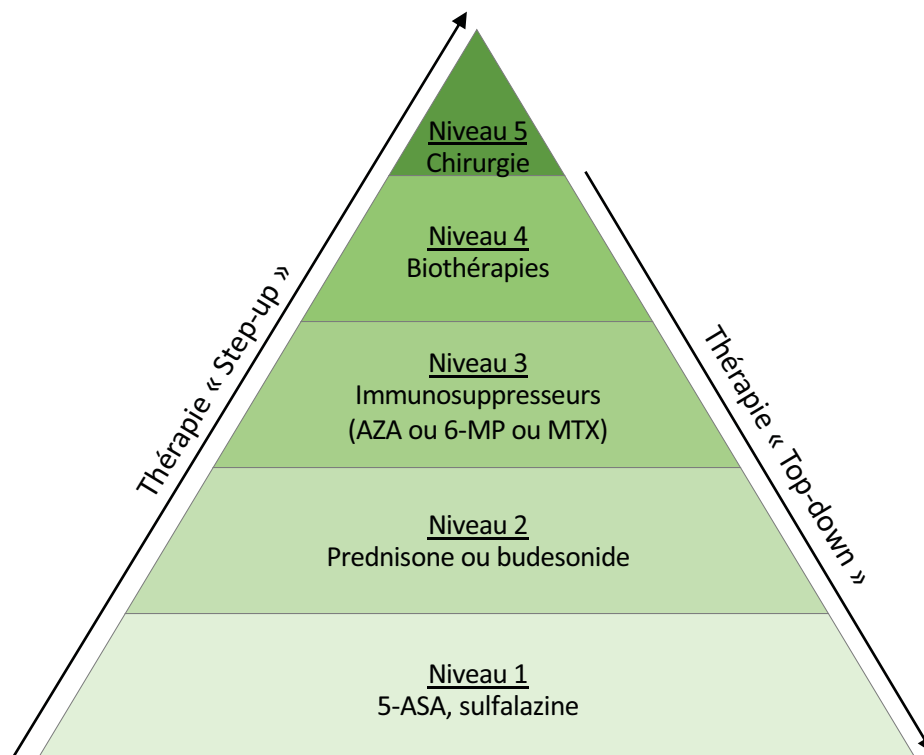
endoscopie (Sipponen *et al.*, 2008; D'Haens *et al.*, 2012; Sipponen & Kolho, 2015; Vernia *et al.*, 2020). Ce biomarqueur est également efficace pour prédire la réponse à un traitement, une rechute ou une récurrence post-opératoire (Boschetti, Garnero, *et al.*, 2015; Boschetti, Laidet, *et al.*, 2015; Vernia *et al.*, 2020). Ainsi, la calprotectine fécale est considérée comme le biomarqueur de référence pour évaluer la MC.

Le potentiel d'autres biomarqueurs fécaux non-invasifs a également été étudié (Di Ruscio *et al.*, 2018). C'est par exemple le cas de la protéine CHI3L1 (« Chitinase 3-like-1 »), qui présente une forte affinité pour la chitine et est exprimée par une grande variété de cellules comme les macrophages ou les neutrophiles. Il a été démontré que les niveaux fécaux de CHI3L1 corrélaient avec l'activité endoscopique de la MC et qu'une valeur seuil de 13,7 ng/g de CHI3L1 était prédictive de lésions actives chez les patients atteints de MICI (Aomatsu *et al.*, 2011). Plus récemment, Buisson et collaborateurs ont montré que CHI3L1 corrélait avec l'activité endoscopique de la maladie et qu'une valeur seuil de CHI3L1 supérieure à 15 ng/g permettait de détecter des ulcérations endoscopiques (Buisson *et al.*, 2016). Ainsi, CHI3L1 apparaît être un biomarqueur fiable pour la détection de l'activité endoscopique dans la MC.

### III. Prise en charge thérapeutique de la MC

À l'heure actuelle, la prise en charge thérapeutique a pour objectif d'atteindre une rémission clinique, résolution des douleurs abdominales et de la diarrhée, et une rémission endoscopique caractérisée par une absence d'ulcérations à l'iléocoloscopie (Peyrin-Biroulet *et al.*, 2015). Cette cicatrisation de la muqueuse est en effet prédictive d'un moindre risque de rechute clinique, d'hospitalisation, de progression de la destruction intestinale et de recours à la chirurgie (Peyrin-Biroulet *et al.*, 2011; Pineton de Chambrun *et al.*, 2010). Il est à noter que les traitements actuels ne sont pas curatifs, ils visent seulement à soulager les symptômes et cicatrifier la muqueuse.

Les traitements disponibles actuellement comprennent les 5-aminosalicylés, les corticoïdes, les immunosuppresseurs avec les thiopurines (incluant l'azathioprine et la 6-mercaptopurine) et le méthotrexate utilisés pour le maintien de la rémission, les biothérapies avec les anticorps anti-TNF- $\alpha$  (infliximab, adalimumab, certolizumab pegol), anti-intégrines comme le védolizumab, qui cible l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  impliquée dans la migration des lymphocytes vers le tractus digestif, ou les anticorps ciblant la sous-unité p40 commune aux interleukines 12 et 23 (ustekinumab) (Gomollón *et al.*, 2017). Des molécules inhibant les Janus Kinases (anti-JAK) devraient être disponibles prochainement. Les anti-TNF- $\alpha$  représentent la classe thérapeutique la plus efficace dans la MC à l'heure actuelle, induisant et maintenant une cicatrisation de la muqueuse, notamment chez les patients ayant une forme modérée à sévère de la MC (Adegbola *et al.*, 2018). La chirurgie est également envisagée chez les patients développant des complications comme des abcès et/ou qui ne tolèrent pas les traitements. Il est estimé

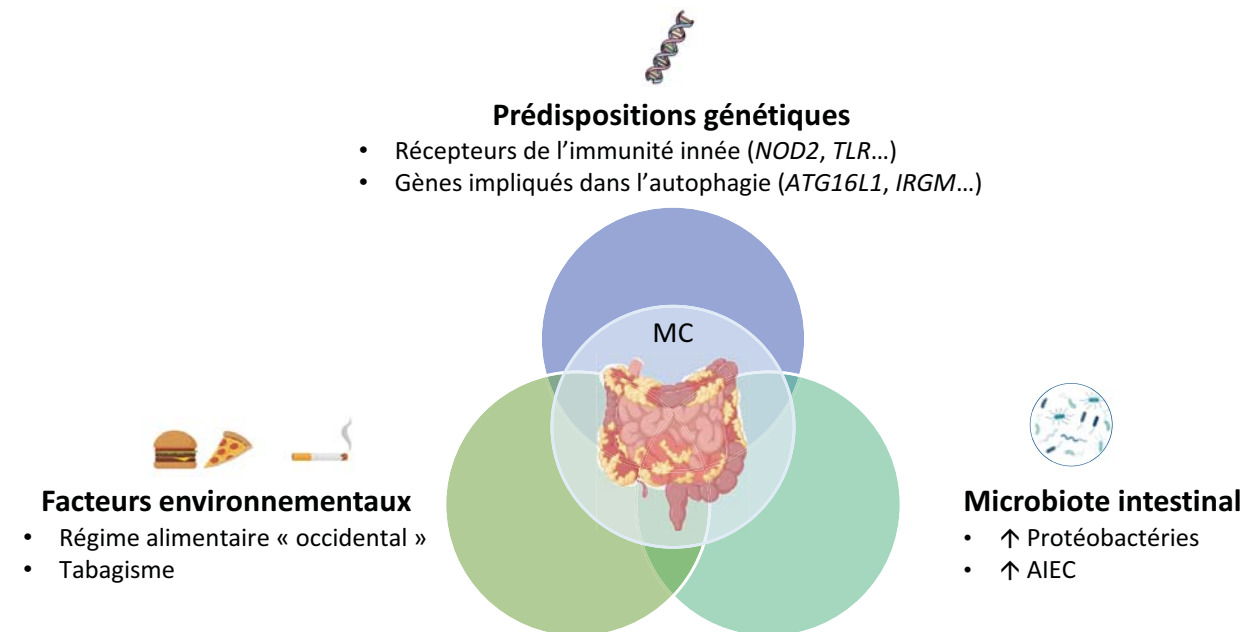


**Figure 40 : Stratégies thérapeutiques utilisées dans la maladie de Crohn.**

À gauche, la stratégie dite « Step-up » consiste en une approche thérapeutique progressive en fonction de l'activité de la maladie, elle est réservée aux formes légères à modérées.

À droite, la stratégie dite « Top-down » est basée sur un traitement plus agressif dès le début de la prise en charge avec des biothérapies associées à un immunosuppresseur. Elle est destinée aux patients présentant une forme sévère et compliquée de la maladie (adaptée de Aloï *et al.*, 2014).

5-ASA : 5-aminosalicylés, 6-MP : 6-mercaptopurine, AZA : Aziathropine, MTX : Méthotrexate.



**Figure 41 : Étiologie multifactorielle de la maladie de Crohn.**

La MC est généralement caractérisée par une réponse immunitaire intestinale aberrante vis-à-vis du microbiote intestinal chez des individus prédisposés génétiquement et sous l'influence d'un mode de vie occidental.

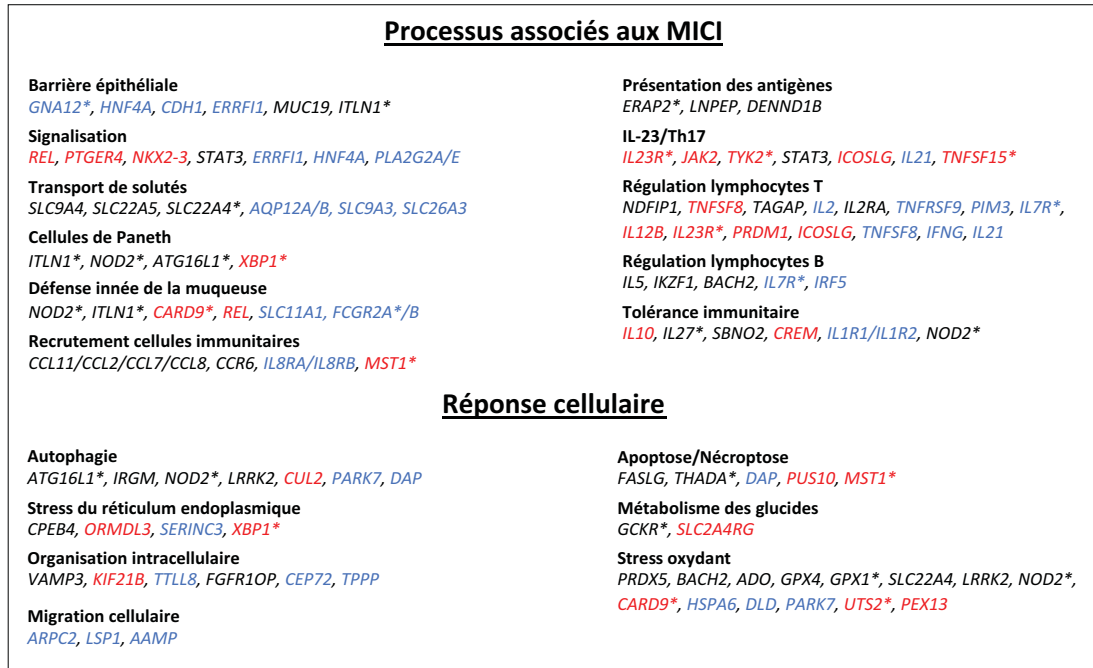
que près de la moitié des patients subiront une opération chirurgicale dans les 10 ans suivant leur diagnostic. Toutefois, les récurrences post-opératoires sont fréquentes. En effet, dans l'année suivant l'opération, une récurrence endoscopique est observée chez 35 à 85% des patients tandis que 10 à 38% des patients présentent une récurrence clinique (Buisson *et al.*, 2012).

Il existe 2 stratégies thérapeutiques : la stratégie conventionnelle, en escalier dite « Step-up » et la stratégie descendante dite « Top-down » (**Figure 40**). La stratégie « Step-up » a pour but de contrôler les symptômes en adaptant progressivement les traitements en fonction de la sévérité et de l'évolution de la maladie : recours aux 5-aminosalicylés, puis aux corticoïdes, aux immunosuppresseurs et aux biothérapies (anti-TNF- $\alpha$ , anti-intégrines, anti-IL-12/23). Cette stratégie est réservée aux formes légères sans facteur de mauvais pronostic ni complication. La stratégie descendante repose sur l'instauration précoce de traitements plus agressifs, une biothérapie (anti-TNF- $\alpha$ ), associée à un immunosuppresseur, chez des patients à risque de maladie sévère et évolutive (Q.-Q. Chen *et al.*, 2014). Des études cliniques ayant cherché à déterminer l'efficacité de ces 2 stratégies dans le contrôle des symptômes, la cicatrisation endoscopique et la rémission des patients atteints de MC ont montré des résultats conflictuels. En effet, la stratégie « Top down » semble plus efficace que la stratégie « Step up » dans certaines études alors que dans d'autres, l'efficacité est similaire avec les 2 stratégies quant à la rémission (D'Haens *et al.*, 2008; Khanna *et al.*, 2015; Tsui & Huynh, 2018).

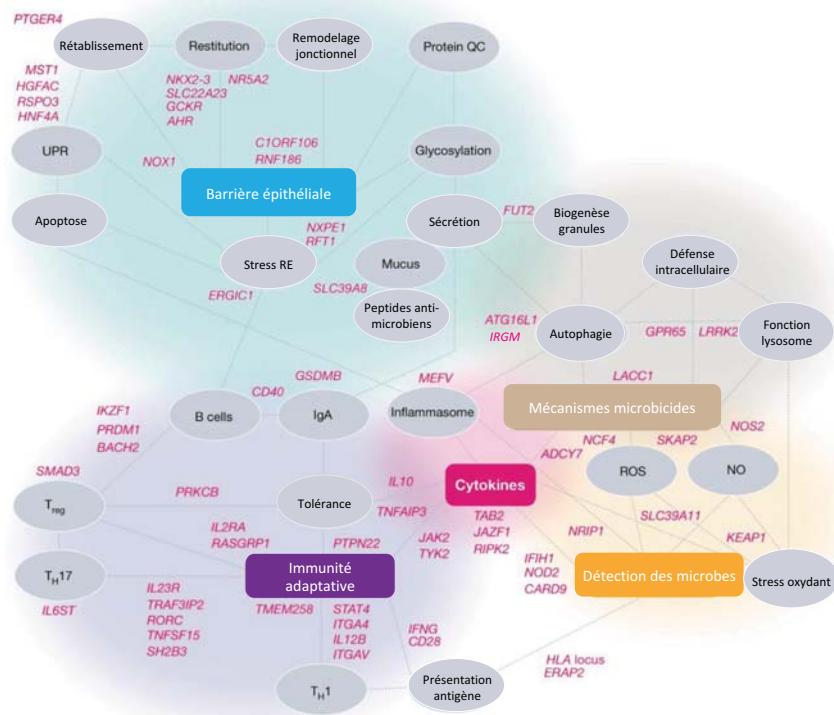
Le rôle du microbiote intestinal dans la pathogenèse de la MC est désormais bien connu et décrit (voir section IV. 2. a.), ce qui a mené au développement de stratégies ciblant le microbiote intestinal telles que les antibiotiques. Ils peuvent être utilisés pour traiter les patients en phase active de la maladie mais aussi pour traiter les complications septiques (abcès, infections post-opératoires) (Nitzan *et al.*, 2016). Les antibiotiques les plus utilisés sont la ciprofloxacine, la clarithromycine, le métronidazole et la rifaximine. Plusieurs méta-analyses ont avancé l'efficacité des antibiotiques (en monothérapie ou en combinaison avec d'autres traitements) sur l'amélioration des symptômes cliniques et la rémission de la MC (Khan *et al.*, 2011; Patterson, 2021; J. W. Su *et al.*, 2015; S.-L. Wang *et al.*, 2012). En effet, dans une méta-analyse, la prise d'antibiotiques était associée à une amélioration clinique de la maladie de 56,1% chez les patients du groupe traité contre 37,9% chez les patients du groupe placebo (S.-L. Wang *et al.*, 2012). D'autres études ont montré que les antibiotiques pouvaient maintenir les rémissions cliniques et prévenir la récurrence post-opérative (Jigaranu *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2011; Rutgeerts *et al.*, 1995).

Toutefois, l'efficacité des antibiotiques n'a pas été démontré dans d'autres études et du fait des effets secondaires associés à la prise d'antibiotiques (infection à *Clostridium difficile*, résistance aux antibiotiques, altérations du microbiote, augmentation de la concentration bactérienne quand arrêt du traitement), leur utilisation n'est recommandé qu'en traitement de seconde ligne, dans le cas où les

**A**



**B**



**Figure 42 : Prédipositions génétiques dans l'étiologie des MICI.**

**A : Processus et voies métaboliques dans lesquels sont impliqués les gènes de susceptibilité associés aux MICI.** La couleur indique si les *loci* sont associés à la maladie de Crohn (MC, noir), la rectocolite hémorragique (RCH, bleue) ou aux MICI (MC + RCH, rouge). Les astérisques indiquent les gènes dont les *loci* identifiés sont porteurs de mutations codantes (adaptée de Khor *et al.*, 2011).

**B : Voies contrôlant l'immunité de la muqueuse dans lesquelles sont impliqués les gènes de susceptibilité associés aux MICI.** Les gènes associés aux MICI (rose) sont impliqués dans des fonctions biologiques clés (cercles gris) qui sont contrôlées par des voies moléculaires interconnectées (rectangles colorés). Les lignes reliant nœuds reflètent les régulations moléculaires chevauchantes par les gènes. Plusieurs gènes régulent plusieurs fonctions biologiques différentes en fonction de leur activité cellule spécifique (adaptée de Graham *et al.*, 2020).



patients présentent des complications septiques (Gomollón *et al.*, 2017; Lichtenstein *et al.*, 2018; Mowat *et al.*, 2011).

## IV. Étiologie de la MC

Concernant l'étiologie de la MC, il est admis qu'elle résulte de l'interaction complexe entre des prédispositions génétiques, des facteurs environnementaux et des altérations du microbiote intestinal menant à des dérégulations de la réponse immunitaire (**Figure 41**).

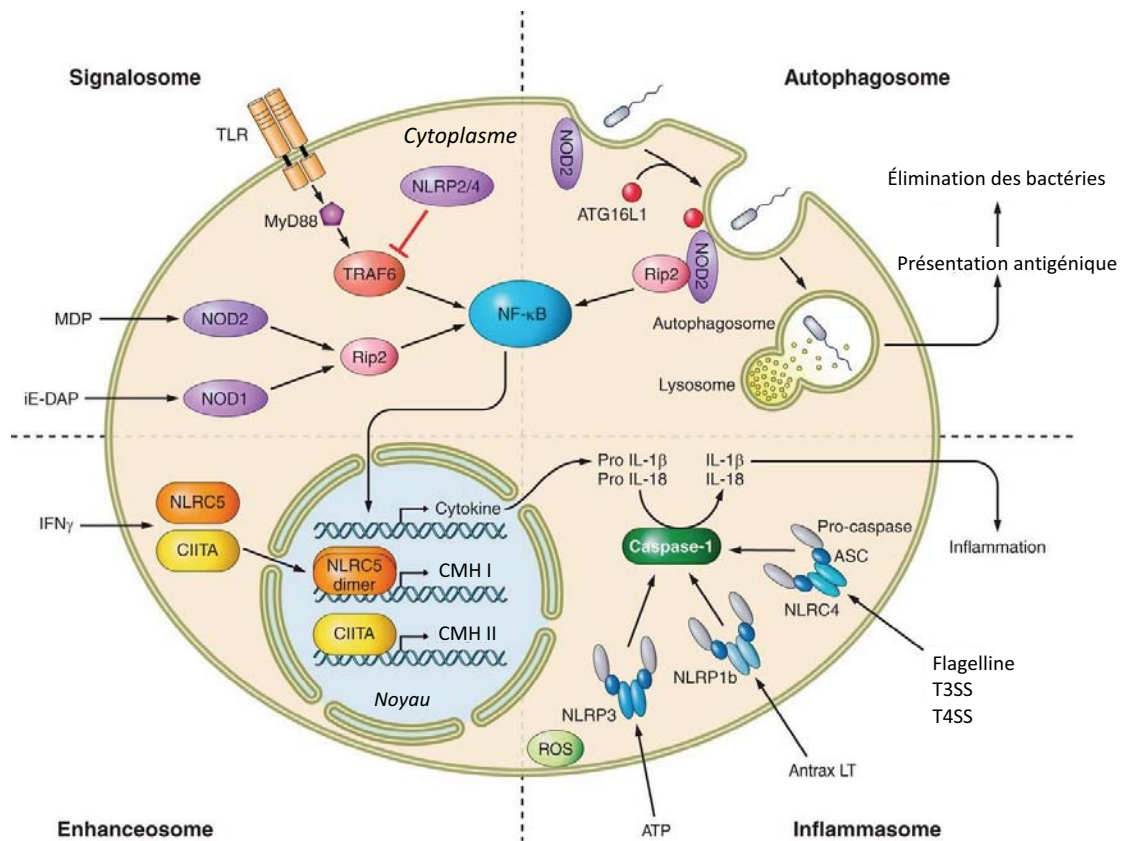
### 1. Facteurs génétiques

L'implication de la génétique dans le développement de la MC repose sur les études réalisées sur des groupes ethniques différents, sur l'observation de cas groupés familiaux ou encore sur des analyses réalisées sur des jumeaux. Par exemple, les populations juives ashkénazes ont un risque 3 à 4 fois plus élevé de développer la MC comparativement aux populations non-juives (Bernstein *et al.*, 2006; Ananthakrishnan, 2015). Concernant les cas familiaux, il a été démontré que 2-14% des patients atteints de MC rapportent une histoire familiale de MICI et le risque de développer la MC est augmenté si une personne de la famille est atteinte. Notamment, un tiers des enfants développera une MICI avant l'âge de 30 ans, si les deux parents en sont atteints tandis que pour un parent du premier degré d'une personne souffrant de la MC, le risque de développer la maladie est 7,8 à 35 fois plus élevé que dans la population générale (Halme *et al.*, 2006; Laharie *et al.*, 2001; Moller *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2018). De plus, une méta-analyse regroupant 6 études sur les jumeaux a rapporté un taux de concordance de la MC de 30,3% pour les jumeaux monozygotes contre 3,6% pour les jumeaux dizygotes (Brant, 2011).

La génétique inverse utilisant des marqueurs génétiques de polymorphismes dont la localisation est connue sur le génome, et plus récemment, les études d'association à l'échelle du génome (GWAS, « genome-wide association study) ont permis d'identifier plus de 240 *loci* de susceptibilité associés avec les MICI, 170 d'entre eux étant associés à la MC (Jostins *et al.*, 2012; J. Z. Liu *et al.*, 2015; de Lange *et al.*, 2017). L'étude de ces *loci* a permis de mettre en évidence de nombreux polymorphismes génétiques (SNP, « Single Nucleotide Polymorphism ») associés à un risque accru de développer la MC. Les gènes de susceptibilité identifiés sont impliqués dans l'immunité innée avec la reconnaissance et la prise en charge des micro-organismes, l'immunité adaptative, l'autophagie, le stress du réticulum endoplasmique ou la fonction barrière (**Figure 42**) (Graham & Xavier, 2020). À ce jour, les gènes codant pour les protéines NOD2, ATG16L1 et IRGM sont les plus étudiés.

#### a. « NOD-like receptors » (NLRs)

Les NLRs sont des récepteurs de l'immunité innée de type PRRs (« Pattern Recognition Receptors »). Chez l'Homme, 22 NLRs ont été identifiés. Les NLRs sont capables de reconnaître différents ligands tels que les molécules associées aux pathogènes (PAMPs) et les molécules associées aux dommages cellulaires (DAMPs) ce qui va déclencher la réponse inflammatoire *via* l'activation de



**Figure 43 : Voies de signalisation cellulaires induites par l'activation des récepteurs « NOD-like ».**

La famille des récepteurs « NOD-like » peut être divisée en 4 catégories fonctionnelles : la transduction du signal (signalosome), l'autophagie (autophagosome), l'activation transcriptionnelle (enhanceosome) et l'assemblage de l'inflammasome (inflammasome). NOD1 et NOD2 sont connus pour activer la voie NF-κB, tandis que les autres NLRs (NLRP2 et NLRP4) sont des régulateurs négatifs de cette voie. L'inflammasome peut être assemblé par différents récepteurs NLRs et activé par de multiples stimuli. NOD2 reconnaît les bactéries au niveau de leur site d'entrée dans la cellule et recrute ATG16L1 au niveau de la membrane plasmique pour initier la formation de l'autophagosome activant ainsi le processus autophagique. CIITA et NLRC5 ont été décrits comme des transactivateurs des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH I et II) (adaptée de Motta *et al.*, 2015).

Antrax LT : Antrax Lethal Factor, CIITA : Class II major histocompatibility complex transactivator, iE-DAP : D-glu-meso-diaminopimelic acid, MDP : Muramyl dipeptide, T3SS : Système de sécrétion de type 3, T4SS : Système de sécrétion de type 4.

l'inflammasome, la transduction du signal, l'activation de la transcription ou de l'autophagie (**Figure 43**) (Y. K. Kim *et al.*, 2016).

### **i. NOD2**

Depuis 2001, il est connu que des polymorphismes dans le gène *NOD2* (« Nucleotide-binding Oligomerization Domain-2 »), également appelé *CARD15*, sont associés à la MC et que ce gène représente le plus grand facteur de risque génétique de MC iléale (J. P. Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001).

Dans l'intestin, *NOD2* est exprimé dans les lymphocytes, les cellules dendritiques et les macrophages, ainsi que dans les cellules de Paneth, les cellules souches, les cellules de caliciformes et dans les entérocytes (Al Nabhani *et al.*, 2017; Ferrand *et al.*, 2018). *NOD2* reconnaît le muramyl dipeptide (MDP), qui est un constituant du peptidoglycane retrouvé dans les bactéries à paroi Gram positive et Gram négative, et cela va mener à l'activation de NF- $\kappa$ B et de la voie MAPK aboutissant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de molécules antimicrobiennes et de mucines (Al Nabhani *et al.*, 2017; de Bruyn & Vermeire, 2017).

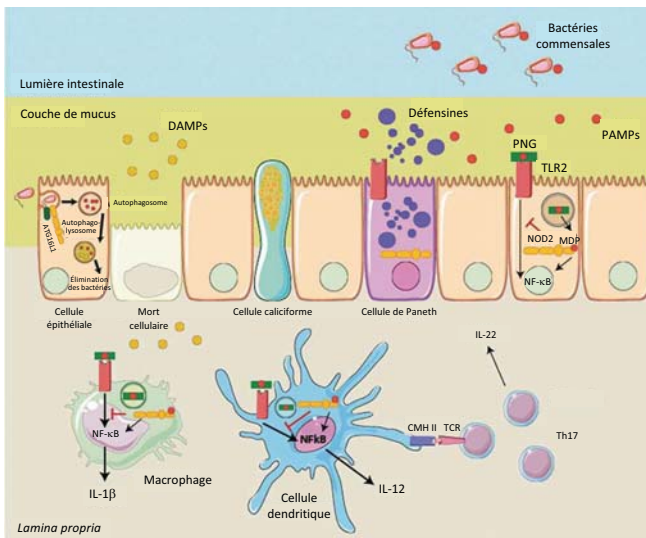
#### **- Polymorphismes dans le gène NOD2 associés à la MC**

Actuellement, trois polymorphismes principaux ont été directement associés à la MC. La première mutation de *NOD2*, Leu1007insC, entraîne un décalage du cadre de lecture aboutissant à une forme tronquée de la protéine ne reconnaissant plus le MDP et conduisant à une altération de l'activation de NF- $\kappa$ B (J. P. Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001). Les 2 autres polymorphismes sont des variants non-sens qui altèrent également la reconnaissance du MDP. Il est important de souligner que ces 3 mutations sont majoritairement retrouvées dans les populations européennes, d'autres variants étant observés chez les patients asiatiques par exemple (de Bruyn & Vermeire, 2017; Sc *et al.*, 2012). De manière intéressante, il a été estimé que les sujets hétérozygotes pour une mutation de *NOD2* avait un risque 2 à 4 fois plus élevé de développer la MC tandis que pour les sujets homozygotes ou hétérozygotes composites (2 allèles à risque différents), le risque était 17,1 à 40 fois plus élevé (de Bruyn & Vermeire, 2017; Economou *et al.*, 2004; J. P. Hugot *et al.*, 2001; J.-P. Hugot *et al.*, 2007; Ogura *et al.*, 2001). Des études ont également démontré que les mutations dans le gène *NOD2* augmentaient le risque de complications de la maladie. Par exemple, le risque de voir la maladie évoluer vers un phénotype fistulant ou sténosant est augmenté de 8% chez les hétérozygotes et de 41% chez les homozygotes ou les hétérozygotes composites et le risque de chirurgie est 58% plus élevé chez les porteurs d'une mutation (Adler *et al.*, 2011).

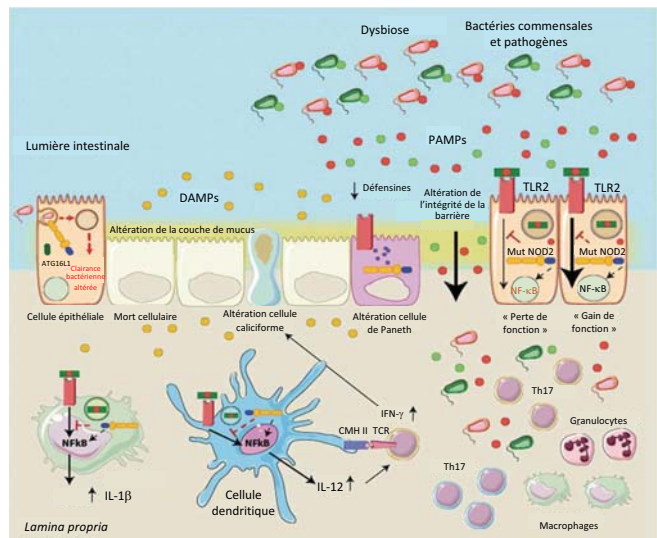
#### **- Conséquences des polymorphismes dans le gène NOD2**

La perte de reconnaissance du MDP va aboutir à une altération de l'induction de NF- $\kappa$ B ce qui semble paradoxal dans le contexte de la MC. Cependant, dans des souris transgéniques exprimant la

## Homéostasie



## Mutations NOD2 dans la maladie de Crohn



**Figure 44 : Rôle de NOD2 dans l'homéostasie intestinale et dans le contexte de la maladie de Crohn (MC).**

**A : En condition homéostasique.** NOD2 joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale *via* la production de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth et *via* la sécrétion de mucus par les cellules caliciformes. La stimulation de NOD2 avec du MDP active NF-κB. NOD2 régule négativement la signalisation impliquant TLR2 limitant l'activation de NF-κB par TLR2. NOD2 est aussi impliqué dans l'autophagie puisqu'il recrute ATG16L1 au niveau du site d'entrée des bactéries ce qui permet à terme l'élimination des bactéries *via* l'autophagie.

**B : Dans la maladie de Crohn.** Les mutations de NOD2 sont associées à une diminution de la production d' $\alpha$ -défensines et de mucus, menant à une altération de l'intégrité de la barrière. La mutation de NOD2 serait incapable de lier le MDP et par conséquent n'activerait pas NF-κB (« perte de fonction »). Cependant, la mutation de NOD2 ne permettrait plus de réguler négativement la signalisation TLR2 suite à la reconnaissance de PNG, menant à la suractivation de NF-κB (« gain de fonction »). Cela va entraîner une augmentation de l'expression de l'IL-12, IL-1β, et IFN-γ conduisant à des dommages des cellules épithéliales et au recrutement de cellules immunitaires au niveau du tissu inflammé. Les mutations de NOD2 résultent aussi en une absence de recrutement de ATG16L1 et donc en une autophagie déficiente (adaptée de de Bruyn and Vermeire, 2017).

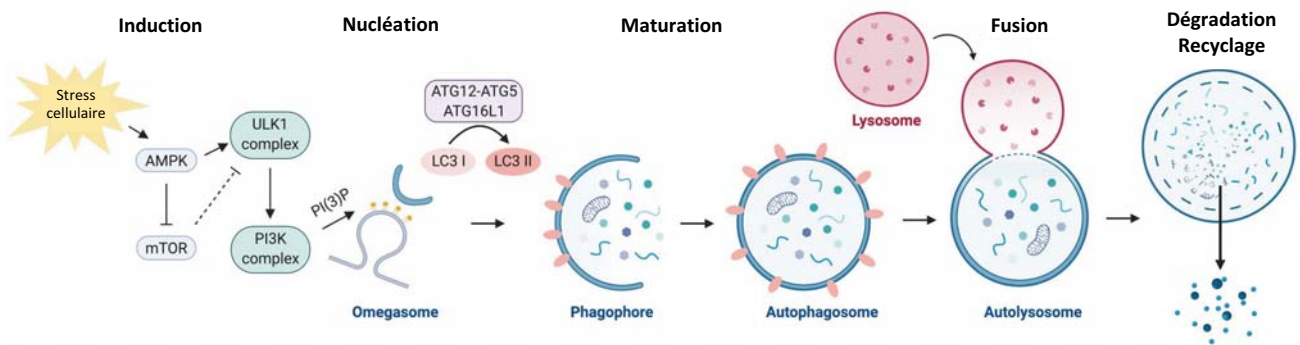
CMH II : complexe majeur d'histocompatibilité 2, DAMPs : Danger-Associated Molecular Patterns, IFN : Interféron, IL : Interleukine, MDP : Muramyl dipeptide, PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns, PNG : Peptidoglycane, TCR : Récepteur des lymphocytes T, Th1 : lymphocyte T helper, TLR : récepteur Toll-like.

variant Leu1007insC, une activation plus forte de NF- $\kappa$ B en réponse à du MDP a été observée rendant les souris plus sensibles à une colite induite au DSS (S. Maeda *et al.*, 2005). Cela pourrait être expliqué par le lien entre NOD2 et TLRs. En effet, l'administration de MDP protège des souris d'une colite induite au DSS *via* la régulation négative de la réponse des TLRs, et dans des souris déficientes pour *NOD2*, une augmentation de l'activation de NF- $\kappa$ B TLR2-dépendante a été observée après stimulation avec du MDP (Watanabe *et al.*, 2004, 2008). Ces résultats suggèrent que l'activation de NOD2 régule négativement la signalisation TLR et que le contrôle négatif de cette voie est levé en présence d'une mutation de *NOD2* aboutissant à une réponse inflammatoire accrue (**Figure 44**).

*NOD2* joue également un rôle important dans la fonction barrière de l'intestin. En effet, une augmentation de la perméabilité intestinale a été associée avec la présence de mutation dans *NOD2* chez des parents de premier degré (Buhner, 2006). Aussi, une diminution de la production d' $\alpha$ -défensines par les cellules de Paneth ainsi qu'une morphologie anormale de ces cellules ont été observées chez des patients atteints de MC présentant une mutation de *NOD2* (Bevins *et al.*, 2009; VanDussen *et al.*, 2014; Wehkamp *et al.*, 2004). L'implication de *NOD2* dans la synthèse de peptides antimicrobiens a été confirmée lors d'une étude de Petnicki-Ocwieja et collaborateurs qui a démontré que des cryptes intestinales isolées de l'iléon de souris déficientes pour *NOD2* présentaient un pouvoir bactéricide diminué altérant la composition du microbiote (Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2009). Cependant, de manière contradictoire, aucune association entre la baisse d'expression des défensines et l'altération de *NOD2* dans des tissus iléaux de patients atteints de MC n'a été trouvée dans une autre étude (Simms *et al.*, 2008). Des altérations dans la formation des cellules caliciformes ainsi qu'une diminution de leur nombre et de la sécrétion de mucines ont été observées dans des modèles murins déficients pour *Nod2* (**Figure 44**) (Al Nabhani *et al.*, 2016; Ramanan *et al.*, 2014). Un développement anormal des plaques de Peyer, avec un excès des cellules M, caractérisé par une perméabilité paracellulaire augmentée et une réponse immunitaire excessive a aussi été décrit chez des souris déficientes pour *Nod2* (Barreau *et al.*, 2007).

Comme *NOD2* joue un rôle important dans la reconnaissance des bactéries, son implication dans le maintien du microbiote intestinal a largement été étudié. Chez l'Homme, il a été montré des associations entre mutations de *NOD2* et altérations du microbiote, notamment avec une augmentation des bactéries *Escherichia coli* et une diminution des bactéries *Clostridia* ou du genre *Firmicutes* (Frank *et al.*, 2011; Knights *et al.*, 2014; E. Li *et al.*, 2012). Des modèles *in vivo* ont également démontré le rôle clé de *NOD2* dans la régulation du microbiote intestinal avec l'observation de dysbiose chez des souris déficientes pour *NOD2* (Al Nabhani *et al.*, 2016; Mondot *et al.*, 2012; Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2009; Ramanan *et al.*, 2014; Rehman *et al.*, 2011). Plus spécifiquement, *NOD2* est aussi impliqué dans le contrôle de bactéries pathogènes telles que *Yersinia pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *E. coli*, *Citrobacter rodentium* ou *Campylobacter jejuni*, la





**Figure 45 : Le processus autophagique.**

Le processus autophagique est régulé positivement par AMPK et négativement par mTOR. Il s'initie par la biogénèse du phagophore (membrane d'isolation provenant du réticulum endoplasmique) impliquant les complexes protéiques ULK1 et PI3K. La maturation et l'élongation de la membrane de l'autophagosome impliquent 2 systèmes de conjugaison, la conjugaison de ATG12 et ATG5 et la conversion de LC3 I en LC3 II, et vont permettre de séquestrer des éléments cytoplasmiques. Les autophagosomes entièrement formés fusionnent avec les lysosomes afin de dégrader leur contenu intracellulaire et recycler certains composants macromoléculaires (adaptée de Chang, 2020)



susceptibilité à l'infection dans des modèles murins déficient pour *NOD2* étant augmentée ou diminuée en fonction de l'agent pathogène testé (Al Nabhani *et al.*, 2017).

## ii. *CARD9*

*CARD9* est un autre NLR pour lequel des variants associés à la MC ont été découverts au fil des années. Les variants rs10870077, rs4077515 et rs10781499 ont été identifiés comme des facteurs de risque dans le développement de la MC (Zhernakova *et al.*, 2008; Y. H. Lee & Song, 2012; Imhann *et al.*, 2018). En revanche, les variants rs141992399 et rs200735402 ont été identifiés comme des variants protecteurs pour la MC (Rivas *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2016). Les effets opposés de ces variants reposent sur des changements dans la structure ou la fonction de la protéine. En effet, les variants qui prédisposent à la MC ont été associés à une expression plus élevée de *CARD9* et à une activation de la réponse immunitaire contre les pathogènes tandis que pour le variant rs141992399, la mutation au niveau du site d'épissage mène à la production d'une protéine *CARD9* tronquée qui ne sera plus capable d'exercer sa fonction biologique, réduisant la réponse immunitaire à l'infection (Cao *et al.*, 2015; Zhernakova *et al.*, 2008). Des modèles *in vivo* ont confirmé que *CARD9* pouvait jouer un rôle important dans la pathogenèse de la MC. En effet, des souris déficientes pour *CARD9* sont plus sensibles à une colite induite au DSS et leur guérison est altérée due à une réponse immunitaire perturbée avec une diminution de l'expression d'*IL-6*, d'*IL-17A*, *IL-22* et de *Reg3γ* (Lamas *et al.*, 2016; Sokol *et al.*, 2013).

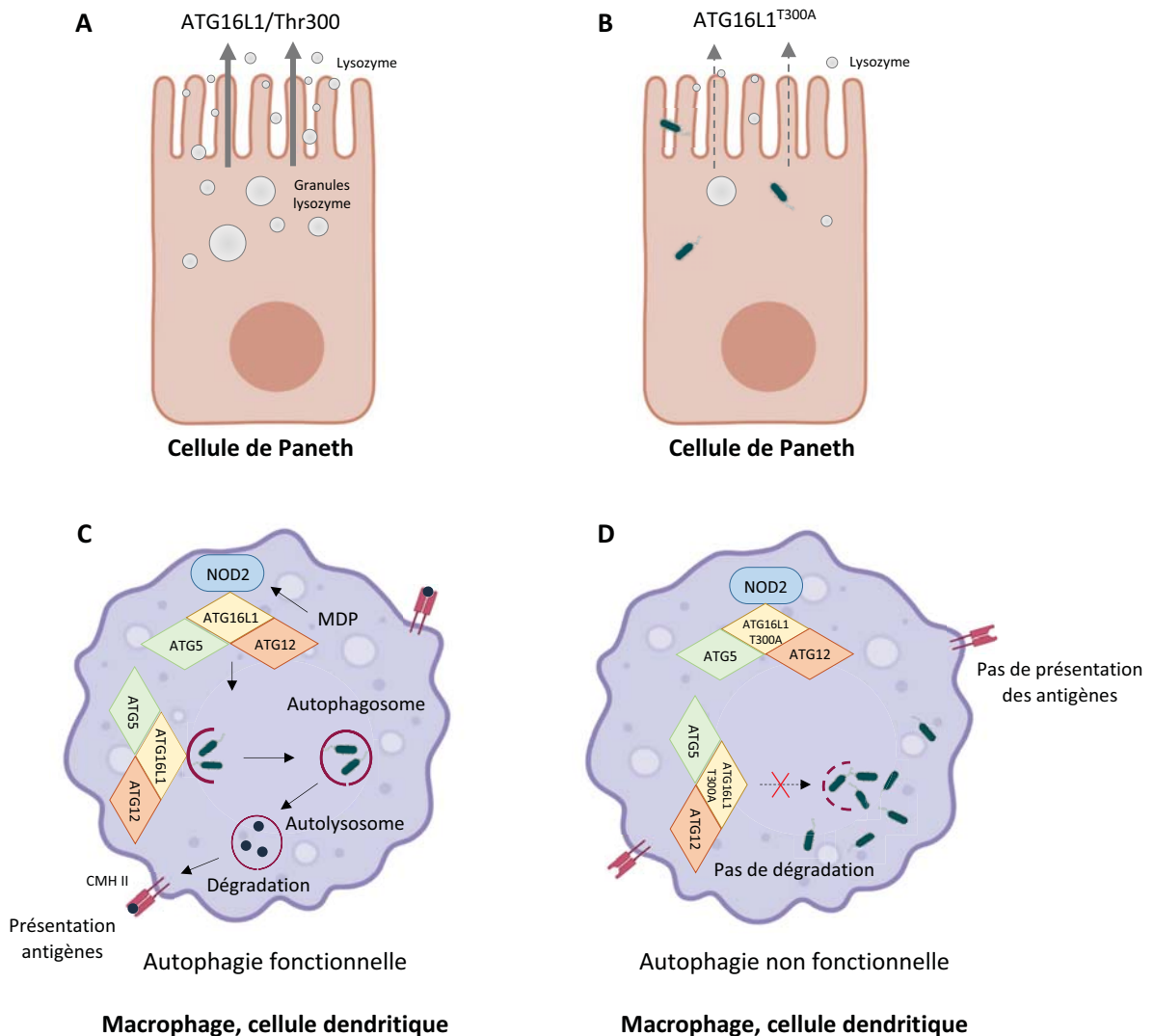
## b. Gènes impliqués dans l'autophagie

L'autophagie est un processus des cellules eucaryotes conservé au cours de l'évolution qui permet de maintenir l'homéostasie cellulaire en condition physiologique et de stress *via* la dégradation lysosomale d'éléments cytoplasmiques, comme des organites cellulaires endommagés, des agrégats protéiques ou encore des pathogènes intracellulaires (**Figure 45**) (Larabi *et al.*, 2019).

Parmi les polymorphismes associés à la MC, plusieurs gènes impliqués dans le processus autophagique ont été identifiés tels que *ATG16L1* (« Autophagy-related gene 16-like-1 »), *IRGM* (« Immunity related GTPase M »), *ULK1* (« Unc-51 like autophagy activating kinase 1 »), *LRRK2* (« Leucine-rich repeat kinase 2 ») ou encore *PTPN2* (« Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2 »). Cependant, concernant les gènes *ULK1*, *LRRK2* et *PTPN2*, leurs rôles et fonctions ne seront pas détaillés ici (Henderson & Stevens, 2012; Spalinger *et al.*, 2016).

### i. *ATG16L1*

Au total, 9 variants génétiques de *ATG16L1* ont été associés à la MC. Toutefois, le variant de risque le plus commun est rs2241880, identifié en 2007 (Hampe *et al.*, 2007). Ce polymorphisme conduit au remplacement d'une thréonine par une alanine (T300A) et son association avec la MC a été confirmée par de nombreuses études menées dans populations européennes (Brest *et al.*, 2010; Hampe *et al.*, 2007; Lacher *et al.*, 2009; Prescott *et al.*, 2007; Rioux *et al.*, 2007; Salem *et al.*, 2015). Même si cette



**Figure 46 : Impact du variant ATG16L1 sur l'autophagie et l'élimination des bactéries intracellulaires.**

**A-B : Dans les cellules de Paneth.** Les cellules de Paneth portant l'allèle à risque ATG16L1<sup>T300A</sup> présentent des défauts de structure, de fonction et d'exocytose des granules comparé aux cellules de Paneth portant l'allèle protecteur (Thr300). Cela mène à une diminution de la concentration en lysozymes au niveau de la couche de mucus, augmentant potentiellement la susceptibilité des cellules à être infectées par des bactéries invasives.

**C-D : Dans les cellules dendritiques et macrophages.** Les bactéries invasives sont détectées par les macrophages et les cellules dendritiques. Dans les macrophages, suite à la reconnaissance du muramyl dipeptide (MDP), NOD2 recrute ATG16L1 à la membrane plasmique, au niveau du site d'entrée des bactéries, activant l'autophagie et la dégradation des bactéries. Les peptides issus de la dégradation des bactéries sont chargés sur le CMH de classe II pour la présentation des antigènes aux lymphocytes T CD4+. Dans les macrophages et cellules dendritiques exprimant l'allèle T300A, la protéine ATG16L1 mutée est toujours capable de s'associer avec NOD2 suite à la reconnaissance de MDP et de recruter ATG12-ATG5. Cependant, l'autophagie n'est plus fonctionnelle dans ces cellules, ce qui inhibe la présentation antigénique et favorise la multiplication des bactéries intracellulaires, menant à une activation excessive du système immunitaire (adaptée de Nguyen *et al.*, 2013).

MDP : Muramyl dipeptide.

association n'a pas été retrouvée dans des populations chinoises, japonaises ou brésiliennes, elle l'a récemment été dans des populations iranienne, algérienne ou grecque (Aida *et al.*, 2018; Brest *et al.*, 2010; Teimoori-Toolabi *et al.*, 2018; Tsianos *et al.*, 2020). De plus, ces études ont montré que *ATG16L1* est plus particulièrement associé à la forme iléale de la MC, forme la plus courante de la MC pour laquelle il est observé une présence anormale d'*E. coli* associés à la muqueuse.

*ATG16L1* est une protéine cruciale dans le processus autophagique puisqu'elle participe à l'élongation de la membrane de l'autophagosome avant fusion de ce dernier avec le lysosome. Dans des cellules humaines exprimant le variant *ATG16L1*<sup>T300A</sup>, il a été observé un défaut d'élimination par autophagie de bactéries telles que *Salmonella* Thypimurium ou certaines souches d'*Escherichia coli* associées à la MC (Kuballa *et al.*, 2008; Lapaquette *et al.*, 2010; Sadaghian Sadabad *et al.*, 2015). En plus d'une autophagie déficiente, il a aussi été observé une altération de la morphologie des cellules caliciformes et une augmentation de la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  dans des cellules myéloïdes dans un modèle de souris « knock-in » exprimant le variant (Lassen *et al.*, 2014). D'autres travaux ont observé des anomalies de structure dans les cellules de Paneth issues de patients homozygotes pour le variant *ATG16L1*<sup>T300A</sup> ou de souris exprimant le variant de risque T300A (**Figure 46A-B**) (Cadwell *et al.*, 2008; Lassen *et al.*, 2014). Une persistance accrue des *Escherichia coli* associées à la MC a également été décrite chez les patients porteurs du polymorphisme et présentant des altérations des cellules de Paneth (Deuring *et al.*, 2014).

Les mécanismes potentiels pouvant lier le variant *ATG16L1* à une autophagie déficiente n'ont que récemment été découverts. Il a été montré que le variant *ATG16L1*<sup>T300A</sup> serait plus sensible à la dégradation dépendante de la caspase 3 en réponse à un stress comparativement à la forme sauvage d'*ATG16L1* (Lassen *et al.*, 2014; Murthy *et al.*, 2014). De plus, ce variant altère la capacité de *ATG16L1* à interagir avec la protéine TMEM59, protéine qui permet d'activer *ATG16L1* et l'autophagie en réponse à l'infection (Boada-Romero *et al.*, 2016).

Il est aussi important de souligner qu'il existe un lien entre *NOD2* et autophagie. En effet, *NOD2* permet le recrutement de *ATG16L1* au niveau du site d'entrée des bactéries permettant l'activation de l'autophagie et l'élimination des bactéries intracellulaires, ces effets étant perdus lorsque *ATG16L1* est muté mais aussi lorsque *NOD2* est muté (**Figure 46C-D**) (Homer *et al.*, 2010; Travassos *et al.*, 2010). D'autres travaux ont aussi montré un défaut d'activation de l'autophagie qui ne permet plus l'élimination des bactéries ainsi qu'un défaut de présentation des antigènes par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II dans des cellules dendritiques exprimant le variant *NOD2* Leu1007insC ou *ATG16L1*<sup>T300A</sup> (Cooney *et al.*, 2010). Ces données confirment l'étroite relation entre *NOD2* et autophagie et soulignent l'importance de la prise en charge des bactéries intracellulaires dans le contexte de la MC.

## ii. *IRGM*

*IRGM* est le second gène impliqué dans le processus autophagique à avoir été identifié comme associé à la MC (Burton *et al.*, 2007; Parkes *et al.*, 2007). Comme pour *ATG16L1*, les polymorphismes dans le gène *IRGM* semblent plus spécifiquement associés à la MC iléale et ils ont été retrouvés dans des cohortes indépendantes d'Amérique du Nord, d'Europe, de Nouvelle-Zélande et de Corée (Brest *et al.*, 2010; Moon *et al.*, 2013; Palomino-Morales *et al.*, 2009; Parkes *et al.*, 2007; R. L. Roberts *et al.*, 2008). *IRGM* joue un rôle clé dans la formation et l'activation du complexe d'initiation de l'autophagie, avec *ULK1* et *BECN1*, tout en se couplant physiquement avec *NOD2* et *ATG16L1*, ce qui est crucial pour les fonctions antimicrobiennes et anti-inflammatoires de l'autophagie (Chauhan *et al.*, 2015).

Une étude réalisée par Rufini et collaborateurs a mis en évidence que le SNP rs13361189 était associé à un risque augmenté d'avoir une MC avec une atteinte iléale ou périanale, d'avoir un phénotype sténosant ou encore de subir une résection intestinale (Rufini *et al.*, 2015). Il a aussi récemment été mis en évidence que les porteurs de ce polymorphisme présentaient une expression de *IRGM* diminuée au niveau sanguin et dans l'iléon terminal et que cette baisse d'expression était associée avec une altération de l'expression de gènes liés à l'autophagie ou à la colite (Ajayi *et al.*, 2019). Parmi les autres polymorphismes de *IRGM*, deux ont particulièrement été associés avec le risque de développer la MC, l'un étant un SNP synonyme dans la région codante (c.313T) (rs10065172), l'autre correspondant à une délétion de 20kb en amont du gène *IRGM* (Y. Lu *et al.*, 2014; McCarroll *et al.*, 2008; Parkes *et al.*, 2007; Prescott *et al.*, 2010). La délétion dans la région promotrice de *IRGM* impacterait le niveau d'expression d'*IRGM*, cependant, dans des cellules hétérozygotes, les allèles de *IRGM* sont exprimés en proportions variables en fonction de la lignée cellulaire.

Grâce à des modèles *in vitro* et *in vivo*, il a été observé que *IRGM* diminue l'activité de l'inflammasome *NLRP3* ce qui protège de la mort cellulaire induite par l'inflammation et de la colite induite au DSS, démontrant le rôle anti-inflammatoire de *IRGM* (Mehto *et al.*, 2019). Dans des études utilisant des modèles *Irgm* déficients, il a été mis en évidence que *IRGM* était impliqué dans l'élimination de bactéries intracellulaires telles que *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp, ou *Mycobacterium tuberculosis* (S. Kim *et al.*, 2019).

Les polymorphismes dans le gène *NOD2* ou dans les gènes de l'autophagie conduisent à une altération de la reconnaissance des bactéries intracellulaires et de leur contrôle par l'autophagie et aboutissent à une altération de la composition du microbiote ce qui renforce l'hypothèse d'un rôle prépondérant du microbiote intestinal et de certains agents bactériens dans la pathogenèse de la MC.

Pour conclure sur les facteurs génétiques, les études à l'échelle du génome ont permis d'identifier de nombreux *loci* de prédisposition à la MC et des corrélations entre mutations et phénotypes iléaux de la MC ont été établies pour plusieurs gènes. Toutefois, malgré la part non négligeable jouée par la génétique dans le développement de la MC, d'autres facteurs sont impliqués dans la pathogenèse de cette maladie, comme des altérations de la composition du microbiote intestinal.

## 2. Facteurs microbiens

Plusieurs études menées dans des modèles *in vivo* ont appuyé le rôle du microbiote et de son déséquilibre (dysbiose) dans le développement de la MC. Par exemple, dans des modèles murins transgéniques développant spontanément une colite ou dans des modèles murins pour lesquels la colite est chimiquement induite, les animaux élevés en condition axénique sont protégés (Contractor *et al.*, 1998; Matsumoto *et al.*, 1998; Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2005). D'autres études ont aussi démontré qu'il était possible de transférer les signes de la MC suite à une transplantation de microbiote fécal d'un donneur atteint de MC à des souris axéniques. De plus, la transplantation de microbiote fécal d'un donneur atteint de MC, ou d'un microbiote simplifié associé à la MC, participe au développement et/ou à l'exacerbation de l'inflammation intestinale chez des souris receveuses axéniques (Britton *et al.*, 2019; Eun *et al.*, 2014; Nagao-Kitamoto *et al.*, 2016; Schaubeck *et al.*, 2016).

De plus, la MC se localise préférentiellement au niveau de l'iléon terminal et du côlon, segments du tractus digestif les plus colonisés par des bactéries, renforçant l'implication du microbiote dans l'étiologie de la MC.

### a. Dysbiose chez les patients

Chez les patients atteints de MC, une dysbiose, ce qui correspond à une altération de la composition et de la diversité du microbiote intestinal, est observée. Diverses études ont fait état d'une diminution de l'abondance mais aussi de modifications de la diversité du microbiote intestinal chez les patients (Alam *et al.*, 2020; Frank *et al.*, 2007; Gevers *et al.*, 2014; Manichanh *et al.*, 2006; Pascal *et al.*, 2017; Walker *et al.*, 2011). Il a été montré qu'au sein d'un même patient atteint de la MC, la diversité microbienne était réduite dans un tissu enflammé vs un tissu non enflammé (Sepehri *et al.*, 2007). De plus, environ un tiers des espèces dominantes chez les patients atteints de MC appartiennent à des groupes phylogénétiques non dominants dans le microbiote des individus sains (Seksik *et al.*, 2003). Au cours de cette étude, il a également été observé que le microbiote des patients atteints de MC était instable au cours du temps comparativement à celui des individus sains (Seksik *et al.*, 2003). De manière générale, il résulte une abondance plus forte des Protéobactéries associée à une plus faible proportion de certains *Firmicutes* (Frank *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2015).

Concernant le phylum des *Firmicutes*, la diminution est principalement due à une réduction de l'abondance de *Blautia faecis* ou *Roseburia inulinivorans* ainsi que de *Faecalibacterium prausnitzii*, *F. prausnitzii* étant connue pour ses propriétés anti-inflammatoires (Fujimoto *et al.*, 2013; Joossens *et al.*, 2011; Lopez-Siles *et al.*, 2014; Prosberg *et al.*, 2016; Sokol *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2016). De plus, une plus faible proportion de *F. prausnitzii* au niveau iléal est associée à un risque accru de récurrence endoscopique 6 mois post-chirurgie (Sokol *et al.*, 2008). Il a aussi été démontré que les patients avec la plus faible abondance de *F. prausnitzii* sont les patients présentant une atteinte iléale (Lopez-Siles *et al.*, 2014). Une méta-analyse regroupant un total de 231 patients a révélé que l'abondance de *F. prausnitzii* était diminuée chez les patients en phase active de la MC comparativement aux patients en rémission, suggérant que *F. prausnitzii* pourrait être un marqueur de l'activité de la MC (Prosberg *et al.*, 2016).

À l'inverse, une augmentation de l'abondance des Protéobactéries, a été observée chez les patients (Baumgart *et al.*, 2007; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Kotlowski *et al.*, 2007; Morgan *et al.*, 2012; Sasaki *et al.*, 2007). L'expansion des Protéobactéries est principalement caractérisée par l'augmentation des bactéries *Escherichia coli*, qui peuvent représenter jusqu'à 100% de microbiote aéro-anaérobie facultatif, et plus particulièrement par l'expansion des *E. coli* adhérentes et invasives (« Adherent-Invasive *E. coli* », AIEC) (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998, 2004). Ces bactéries, associées à, ou ayant envahies la muqueuse iléale, sont retrouvées, chez 21 à 62% des patients atteints de MC contre seulement 0-19% des contrôles (Baumgart *et al.*, 2007; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998, 2004; Martinez-Medina *et al.*, 2009; Palmela *et al.*, 2018; Raso *et al.*, 2011). Des espèces bactériennes connues pour avoir un rôle néfaste pour l'homéostasie intestinale, telles que *Ruminococcus gnavus* et *Ruminococcus torques*, sont aussi trouvées en plus grande abondance chez les patients atteints de MC (Joossens *et al.*, 2011; Png *et al.*, 2010). Ce sont des bactéries mucolytiques, capables de dégrader le mucus. Leur augmentation pourrait expliquer le fait que davantage de bactéries sont retrouvées dans le mucus des patients atteints de MC (Png *et al.*, 2010; Schultz *et al.*, 1999). À l'inverse, *Akkermansia muciniphila*, autre bactérie mucolytique, est diminuée chez les patients atteints de MC comparativement aux sujets contrôles (Png *et al.*, 2010).

Récemment, Pascal et collaborateurs ont proposé une signature microbienne qui pourraient permettre de détecter la MC : une diminution de l'abondance des bactéries *Faecalibacterium*, *Peptostreptococcaceae*, *Anaerostipes*, *Methanobrevibacter*, *Christensenellaceae*, *Collinsella*, associée à une augmentation de l'abondance de *Fusobacterium* et *Escherichia* (Pascal *et al.*, 2017). De plus, une autre étude a montré qu'une composition spécifique du microbiote iléal au moment de la chirurgie pouvait être prédictif de la récurrence endoscopique (Sokol *et al.*, 2020).

Du fait de ses fonctions, il faut également prendre en compte que les perturbations du microbiote intestinal résultent en des modifications métaboliques. En effet, 12% des voies métaboliques sont modifiées chez les patients atteints de MICI comparativement aux sujets sains (Morgan *et al.*, 2012). Il



est donc important d'étudier le métabolome associé au microbiote intestinal chez les patients atteints de MC pour mieux comprendre la maladie et développer de nouveaux traitements. Les données actuelles montrent une diminution de la production d'AGCC, d'acides aminés et d'acides biliaries secondaires ainsi qu'une augmentation du stress oxydant ou du transport des acides aminés et du sulfate chez les patients atteints de MICI (M. Li *et al.*, 2022; Zuo & Ng, 2018).

### **b. Le microbiote fongique**

La détection d'anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* dans le sérum des patients atteints de MC a conduit à suggérer un rôle du microbiote fongique dans la pathogenèse de la MC (Halfvarson *et al.*, 2005; McKenzie *et al.*, 1990; Vermeire *et al.*, 2001). Les Ascomycètes et les Basidiomycètes représentent les taxa les plus importants au sein du microbiote. La plupart des études ont observé que le ratio Basidiomycètes/Ascomycètes était augmenté chez les patients atteints de MC malgré une analyse inverse de Nelson et collaborateurs (Limon *et al.*, 2019; Mukhopadhyaya *et al.*, 2015; Nelson *et al.*, 2021; Sokol *et al.*, 2017). De manière plus spécifique, plusieurs études ont montré une diminution de *Saccharomyces cerevisiae* ainsi qu'une plus forte abondance de *Candida albicans*, *C. tropicalis* et d'autres taxa de *Candida* chez les patients atteints de MC (Chehoud *et al.*, 2015; Hoarau *et al.*, 2016; Q. Li *et al.*, 2014; X. V. Li *et al.*, 2019; Liguori *et al.*, 2016; Sokol *et al.*, 2017). Ainsi, ces résultats suggèrent un rôle de *Candida* dans la pathogenèse de la MC. Une augmentation de l'abondance de *Malassezia restricta* a aussi été observée chez les patients atteints de MC comparativement à des sujets sains, et cette augmentation d'abondance est liée à la présence d'un polymorphisme dans le gène *CARD9* (Limon *et al.*, 2019). Au cours de ces études, il a été démontré des corrélations entre les modifications du microbiote bactérien et fongique, suggérant l'existence d'altérations inter-règnes spécifiques à la MC (Hoarau *et al.*, 2016; Sokol *et al.*, 2017). Dans cette idée, une étude a identifié que la présence de *S. cerevisiae* était associée avec un environnement intestinal favorable pour le développement de bactéries bénéfiques telle que *Faecalibacterium*, tandis que l'absence de levures ou la présence d'autres espèces de levures était associée avec la présence de bactéries pathogènes potentielles (Di Paola *et al.*, 2020).

Il est important de noter qu'en fonction des études, les résultats peuvent être contradictoires, ce qui seraient potentiellement dû aux différentes méthodes d'extraction d'ADN fongique utilisées (Mahmoudi *et al.*, 2021).

### **c. Le microbiote viral**

Concernant le microbiote viral, il est majoritairement composé des bactériophages *Caudovirales* et *Microviridae* (Minot *et al.*, 2013; Reyes *et al.*, 2010). Le microbiote viral des patients atteints de MC présente une plus faible diversité mais une plus grande variabilité comparativement à celui des contrôles (Pérez-Brocal *et al.*, 2013). Une augmentation de la richesse en bactériophages, avec une expansion significative des *Caudovirales*, associée à une réduction de la richesse et diversité bactérienne a été

révélée chez les patients atteints de MC comparé aux contrôles (Norman *et al.*, 2015). En utilisant les données de Norman et collaborateurs, une autre étude a montré que les patients atteints de MC présentaient une altération de la composition du virome, le core de phages virulents étant remplacé par des bactériophages dits tempérés (phages s'intégrant au génome bactérien, au cycle lysogénique) (Clooney *et al.*, 2019). Davantage de *Caudovirales* ont été retrouvés dans les tissus, les lavages intestinaux et les fèces de patients pédiatriques atteints de MC comparativement à des contrôles (Fernandes *et al.*, 2019; Wagner *et al.*, 2013). Des phages spécifiques de *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Lactobacillus* ont été retrouvés dans les fèces de patients japonais atteints de MC (Imai *et al.*, 2022). Comme dans les travaux de Norman et collaborateurs, ces modifications du virome sont associées à des altérations du microbiote intestinal, notamment à une diminution de *Faecalibacterium*, *Roseburia* et *Ruminococcus* et une augmentation des *Enterobacteriaceae*, suggérant une nouvelle fois des altérations inter-règnes (Imai *et al.*, 2022)

Concernant les virus eucaryotes, une plus forte abondance de *Hepeviridae* et un niveau plus faible de *Virgaviridae* ont été observés au niveau des muqueuses de patients atteints de MC n'ayant reçu aucun traitement, comparativement aux sujets contrôles, suggérant que certains virus eucaryotes pourraient participer au développement de l'inflammation intestinale (F. Ungaro *et al.*, 2018). Des études dans des modèles murins transgéniques vont également dans ce sens puisqu'ils ont démontré que l'infection avec le virus eucaryote *Norovirus* contribuait au développement de l'inflammation intestinale (Basic *et al.*, 2014; Cadwell *et al.*, 2010).

#### **d. Bactéries impliquées dans la MC**

##### **i. *Yersinia* et *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis***

Dans les années 2000, il a été proposé que les espèces du genre *Yersinia* pourraient contribuer à l'apparition et la persistance de l'inflammation intestinale chez les patients souffrant de la MC (J.-P. Hugot *et al.*, 2003). La Yersiniose et la MC sont des pathologies qui se ressemblent, partageant des aspects communs, tels qu'une inflammation intestinale qui se concentre initialement autour de l'épithélium associé au follicule et qui peut progresser en ulcères plus profonds et plus diffus (Fujimura *et al.*, 1996; Grützkau *et al.*, 1990; Krauss *et al.*, 2012; Naddei *et al.*, 2017). Au cours des années, plusieurs études ont montré la présence d'espèces de *Yersinia* au niveau intestinal chez les patients atteints de MC mais également chez des individus contrôles (Chiodini *et al.*, 2013; Kallinowski *et al.*, 1998; Knösel *et al.*, 2009; Lamps *et al.*, 2003; Leu *et al.*, 2013). L'étude la plus récente en date étudiant la présence de *Yersinia* dans 470 échantillons a révélé sa présence dans 7,6% des échantillons iléaux de patients atteints de MC contre 7,9% des échantillons de contrôles (Le Baut *et al.*, 2018). Ainsi, les espèces de *Yersinia* sont normalement et peu présentes au niveau de l'iléon humain, que ce soit chez des individus contrôles ou malades. Malgré l'observation que *NOD2* jouait un rôle critique dans la réponse de l'hôte lors de l'infection par *Y. pseudotuberculosis*, d'autres études sont nécessaires pour étudier la

réponse immunitaire intestinale contre *Yersinia* afin de déterminer si ce genre bactérien pourrait être impliqué dans la MC (Al Nabhani *et al.*, 2017; Meinzer *et al.*, 2008, 2012).

*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) a également été suspecté dans l'étiologie de la MC. L'ADN de MAP a été détecté dans plusieurs types d'échantillons (biopsies, sang périphérique, granulomes), de manière plus fréquente chez les patients atteints de MC que chez les sujets sains (Autschbach *et al.*, 2005; Hulten *et al.*, 2001; Naser *et al.*, 2004; Nazareth *et al.*, 2015; Schwartz *et al.*, 2000; Zamani *et al.*, 2017; Zarei-Kordshouli *et al.*, 2019). L'association entre MAP et MC a aussi été démontrée grâce à des méta-analyses (Abubakar *et al.*, 2008; Feller *et al.*, 2007). Toutefois, il est important de noter que d'autres études n'ont pas permis de mettre en évidence cette association (Naser *et al.*, 2014). Des études cliniques ont montré que l'administration de nitroimidazoles ou macrolides ainsi qu'une combinaison d'antibiotiques anti-mycobactéries pouvaient induire une rémission chez les patients avec une MC active (Feller *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2011). L'administration en combinaison de clarithromycine, clofazimine et rifabutine permet d'obtenir des rémissions cliniques et histologiques chez les patients atteints de MC avec une forme active (Borody *et al.*, 2002, 2007; Selby *et al.*, 2007; Shafran *et al.*, 2002). Toutefois, concernant l'étude de Selby et collaborateurs, même si 66% des patients étaient en rémission après 16 semaines de traitement, aucune différence n'est observée entre le groupe traité et le groupe placebo au bout de 2 ans de traitement concernant la récurrence, remettant en cause le rôle de MAP dans la pathogenèse de la MC (Selby *et al.*, 2007). Plus récemment, la nouvelle thérapie RHB-104 (RedHill Biopharma®) combinant les 3 antibiotiques mentionnés précédemment (clarithromycine, clofazimine et rifabutine) est en cours d'étude chez des patients présentant une MC modérée à sévère. Jusqu'à présent les résultats sont prometteurs, davantage de patients comparativement au groupe placebo étant en rémission clinique après 16 et 24 semaines de traitement (Honap *et al.*, 2020).

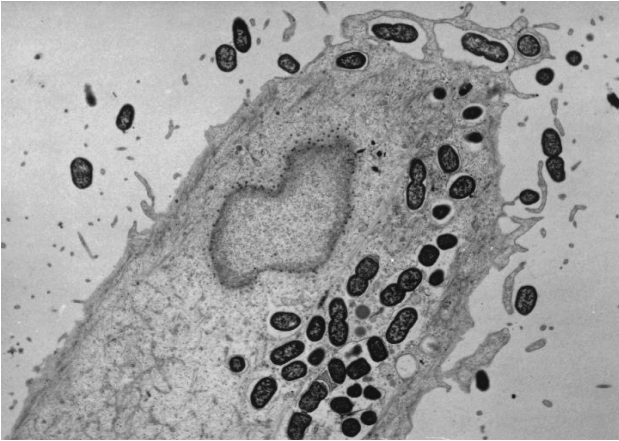
Il ne faut toutefois pas oublier que ces antibiotiques destinés à éliminer les mycobactéries sont également actifs sur d'autres espèces bactériennes du microbiote intestinal. Ainsi, ils pourraient cibler des espèces bactériennes néfastes, ce qui pourrait mener à une amélioration des symptômes, sans valider le rôle causal de MAP dans l'étiologie de la MC.

## **ii. *Escherichia coli* adhérents et invasifs : AIEC**

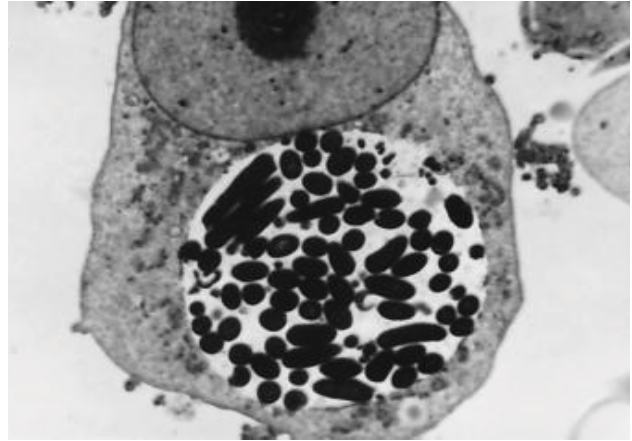
### **- Présentation du pathovar**

Les capacités des souches d'*E. coli* particulièrement retrouvées chez les patients atteints de MC, à adhérer à et envahir les cellules épithéliales intestinales (CEIs), à survivre et se répliquer en macrophages ainsi qu'à induire la libération de TNF- $\alpha$  par les macrophages infectés, a conduit, il y a 25 ans, à la définition du pathovar AIEC pour *Escherichia coli* adhérents et invasifs (Boudeau *et al.*, 1999; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998, 2004; Glasser *et al.*, 2001). La prévalence des AIEC varie de 21 à 62% chez les patients atteints de MC contre 0 à 19% chez les contrôles et ces bactéries sont plus fréquemment

**A**



**B**



**Figure 47 : Caractéristiques phénotypiques des *Escherichia coli* adhérents et invasifs associés à la MC.**

**A : Cliché de microscopie électronique à transmission (MET) de cellules épithéliales Hep-2 infectées par la souche AIEC LF82.** Les bactéries AIEC sont capables d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales (x6200, d'après Boudeau *et al.*, 1999).

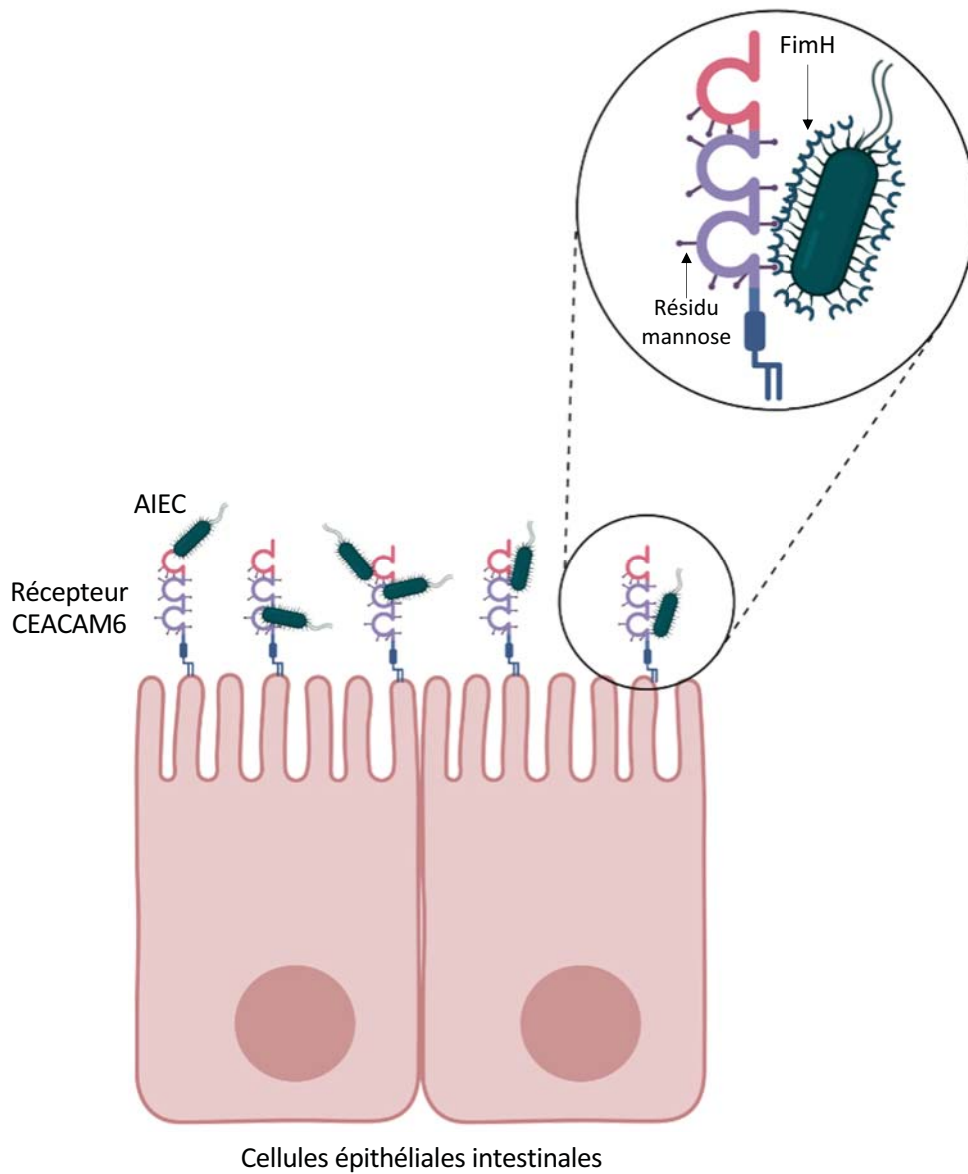
**B : Cliché de MET de macrophages murins J7774-A1 après 24h d'infection par la souche AIEC LF82.** Les bactéries AIEC sont capables de survivre et de se répliquer au sein des macrophages dans une large vacuole (x7200, d'après Glasser *et al.*, 2001).

associées à l'iléon qu'au côlon (Baumgart *et al.*, 2007; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Martinez-Medina *et al.*, 2009; Palmela *et al.*, 2018; Raso *et al.*, 2011). Deux récentes méta-analyses ont montré que la prévalence des AIEC chez les patients atteints de MC était de 29% contre 9% chez les sujets sains (Kamali Dolatabadi *et al.*, 2021; Nadalian *et al.*, 2021). De plus, il a été démontré que la présence d'AIEC au niveau de la pièce opératoire des patients atteints de MC était prédictive de la récurrence endoscopique 6 mois post-chirurgie. Aussi, la présence des bactéries AIEC au niveau de l'iléon terminal des patients 6 mois post-chirurgie était associée aux formes précoces de lésions iléales démontrant un rôle causal des AIEC dans la MC (Buisson *et al.*, 2022). Il n'existe pas de gène ou de marqueur moléculaire spécifique et commun aux AIEC, rendant difficile l'identification des patients porteurs de ces bactéries (O'Brien *et al.*, 2017). Un algorithme pouvant prédire le phénotype des AIEC avec 84% de précision a été élaboré. Cependant, cet algorithme n'a pas fait ses preuves sur d'autres collections de souches AIEC, la précision de la prédiction du phénotype des AIEC sur des souches issues de différentes cohortes diminuant à 61% (Camprubí-Font *et al.*, 2018, 2020). Une récente étude caractérisant les OMPs (« Outer Membrane Protein ») des AIEC et d'une souche commensale d'*E. coli* a permis d'identifier 3 gènes, *chuA*, *efcC* et *fitA*, qui pourraient constituer de potentiels biomarqueurs des AIEC (Saitz *et al.*, 2022). Toutefois, d'autres études sont nécessaires pour valider ces marqueurs dans d'autres collections de souches AIEC issues de différentes régions géographiques. Ainsi, le seul moyen d'identifier les AIEC à ce jour repose toujours sur l'étude de la capacité des souches d'*E. coli* à adhérer à et envahir les CEIs ainsi qu'à survivre et se répliquer au sein des macrophages *in vitro* (**Figure 47**). La souche d'*E. coli* LF82 (pour Lille-France), isolée au niveau d'une lésion iléale chronique chez un patient atteint de MC, est la souche AIEC de référence du laboratoire qui est particulièrement étudiée (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998, 2004). Les AIEC ne sont pas des pathogènes stricts mais des pathobiontes capables de tirer avantage d'un polymorphisme génétique et/ou d'un environnement intestinal spécifique pour coloniser la muqueuse iléale et induire l'inflammation intestinale. En effet, les bactéries AIEC sont connues pour jouer un rôle dans l'induction et/ou le maintien de l'inflammation intestinale dans des modèles précliniques de MC, renforçant leur implication dans l'étiologie de la maladie (Carvalho *et al.*, 2009; Chassaing *et al.*, 2014; Schmitz *et al.*, 2019).

#### - *Interaction des AIEC avec l'épithélium intestinal*

De nombreuses études ont porté sur les bactéries AIEC afin de comprendre leur rôle dans la MC. Ainsi, différents facteurs de virulence leur permettant par exemple, d'accéder à l'épithélium intestinal (*vat-AIEC*, *fliC*, *ar1A*, *ar1C*), d'adhérer et d'envahir les CEIs (*fimH*, *chiA*, *yfgL*, *ompA*, *ibeA*) de survivre en macrophages (*htrA*, *dsbA*, *gipA*) ou qui leur procurent un avantage compétitif dans l'environnement intestinal (*pduC*, *chuA*) ont été identifiés (Palmela *et al.*, 2018).

Les AIEC possèdent la mucinase Vat-AIEC, dont l'expression est régulée par les acides biliaires et les mucines, qui leur permet de dégrader et traverser le mucus afin d'accéder à et de coloniser



**Figure 48 : Interaction CEACAM6-FimH.**

Les bactéries AIEC adhèrent aux cellules épithéliales intestinales *via* l'interaction entre la glycoprotéine cellulaire CEACAM6 et l'adhésine bactérienne FimH. Le récepteur CEACAM6, exprimé à la surface des cellules épithéliales intestinales, présente des résidus mannosylés qui vont être reconnus par l'adhésine FimH bactérienne localisée à l'extrémité des pili de type I.



l'épithélium intestinal (Gibold *et al.*, 2016). Les travaux de Sevrin et collaborateurs ont montré que les AIEC étaient capables de réguler finement la production de leurs flagelles dans l'environnement intestinal, le mucus et les acides biliaires induisant l'expression du gène *fliC* contrairement au contact avec l'épithélium qui la réprime, ce qui évite une hyper-activation du système immunitaire et favorise leur persistance à long-terme dans le tractus digestif (Sevrin *et al.*, 2020).

Les bactéries AIEC utilisent différentes stratégies pour interagir avec les CEIs et les envahir. Une des interactions les mieux caractérisées est l'interaction CEACAM6 (« Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 ») – FimH. FimH est l'adhésine présente à l'extrémité des pili de type I qui permet l'adhésion des bactéries aux CEIs et qui est également importante pour l'invasion des cellules de l'hôte (Boudeau *et al.*, 2001). Des mutations patho-adaptatives dans le gène *fimH* augmentent la capacité des AIEC à adhérer aux CEIs (Dreux *et al.*, 2013). Les AIEC vont ainsi interagir *via* FimH avec les résidus mannosylés présents sur CEACAM6 (**Figure 48**). Ce récepteur est fortement exprimé dans la muqueuse iléale des patients atteints de MC, alors qu'il ne l'est pas en conditions physiologiques (Barnich *et al.*, 2007). Récemment, 2 glycanes mannosylés sur la protéine CEACAM6 qui pourraient être de potentiels récepteurs pour l'adhésine FimH ont été identifiés. Il a aussi été révélé lors de cette étude que les AIEC étaient capables d'interagir avec les résidus mannoses exposés sur les cellules en début d'apoptose ce qui favoriserait la propagation des bactéries dans les espaces intercellulaires (Dumych *et al.*, 2018). Les AIEC peuvent également adhérer aux CEIs *via* la protéine CHI3L1, qui est surexprimée par les CEIs et les macrophages de la *lamina propria* lors d'une inflammation intestinale (C.-C. Chen *et al.*, 2011; Mizoguchi, 2006). De plus, la surexpression de CHI3L1 favorise l'adhésion et l'internalisation des bactéries dans les CEIs, exacerbant la colite chez la souris (Mizoguchi, 2006). Cette interaction se fait *via* le domaine de liaison à la chitine bactérien de ChiA qui reconnaît un résidu glycosylé de CHI3L1 (Low *et al.*, 2013). L'interaction hôte-AIEC peut aussi se produire au niveau de plaques de Peyer, où sont localisées les cellules M, *via* les « Long Polar Fimbriae » des AIEC, dont l'expression est régulée par la concentration en acides biliaires. Cette interaction va favoriser la translocation des AIEC *via* les cellules M (Chassaing *et al.*, 2011, 2013; Keita *et al.*, 2020).

Les « Outer Membrane Vesicles » (OMVs), dont la production est dépendante du gène *yfgI*, sont impliquées dans la capacité d'invasion des souches AIEC *via* la libération d'effecteurs bactériens dans les cellules hôtes (Rolhion *et al.*, 2005). La protéine de surface des OMVs, OmpA, se lie à la protéine Gp96 surexprimée à la surface apicale des CEIs de l'iléon des patients atteints de MC. L'interaction OmpA-Gp96 favorise la fusion des OMVs avec les CEIs ainsi que l'entrée des AIEC *via* la libération dans la cellule hôte de protéines et molécules qui restent à identifier (Rolhion *et al.*, 2010, 2011).

### - *Conséquences de l'interaction des AIEC avec l'épithélium*

L'effet de l'infection par les AIEC sur la fonction barrière intestinale a été étudié dans différents modèles. *In vitro*, l'infection par les bactéries AIEC diminue la résistance électrique transépithéliale d'une monocouche de CEIs et induit la délocalisation des protéines ZO-1 et E-cadherin ainsi que la désorganisation de la F-actine, ce qui suggère que les AIEC pourraient être impliquées dans l'altération de la fonction barrière observée chez les patients (Sasaki *et al.*, 2007; Wine *et al.*, 2009). Dans le modèle murin CEABAC10 mimant la susceptibilité à développer la MC (souris surexprimant *CEACAM6* humain au niveau colique), l'infection par les AIEC mène à une augmentation, dépendante des pili de type I, de la perméabilité intestinale et à l'induction de l'expression de la protéine claudine-2 dans les CEIs. Au cours de cette étude, il a également été démontré une surexpression de la claudine-2 et de *CEACAM6* chez les patients atteints de MC, qu'ils soient en phase active ou non. Il est important de prendre en compte que dans ce modèle, la surexpression des gènes *CEACAMs* est associée à une augmentation anormale de la perméabilité intestinale sans signe d'inflammation, et que les souris sont plus sensibles à une colite induite au DSS, suggérant que la surexpression de *CEACAM6* observée dans la muqueuse iléale des patients pourrait altérer l'intégrité de la barrière intestinale (Denizot *et al.*, 2012).

L'interaction des AIEC avec l'épithélium intestinal résulte aussi en l'induction de la réponse inflammatoire. En effet, l'infection par la souche AIEC LF82 aggrave une colite induite au DSS chez les souris, caractérisée par d'importantes altérations histologiques et une augmentation de l'expression de *IL-1 $\beta$*  et de *IL-6* (Carvalho *et al.*, 2008). Chez les souris CEABAC10, les bactéries AIEC persistent au niveau intestinal et induisent une colite sévère caractérisée par des zones d'érosion de l'épithélium, une inflammation de la muqueuse et une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Carvalho *et al.*, 2009). Guo et collaborateurs ont aussi démontré que l'infection de souris *IL-10* KO par la souche AIEC LF82 exacerbait la colite, avec une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (*IL-6*, *IL-8*, *TNF- $\alpha$* ) (Z. Guo *et al.*, 2018). Aussi, les macrophages infectés sécrètent de grande quantité de *TNF- $\alpha$* , ce qui favorise la réplication intracellulaire des AIEC *in vitro*, alors que l'incubation avec des anticorps anti-*TNF- $\alpha$*  bloque cette réplication intracellulaire (Bringer *et al.*, 2012). Récemment, il a été montré que les anticorps anti-*TNF* étaient capables de limiter la réplication intracellulaire des AIEC dans les macrophages issus de patients atteints de MC en modulant l'expression de la Flotillin-1 et de *CHI3L1* (Douadi *et al.*, 2022). Les cytokines pro-inflammatoires sont connues pour moduler l'expression et la localisation des protéines de jonction, altérant la fonction barrière (R. Al-Sadi *et al.*, 2009). Ainsi, l'effet de l'infection par les AIEC sur la barrière intestinale peut résulter soit d'un effet direct, ou indirect *via* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules infectées.

### - *Contrôle de la prolifération des bactéries AIEC*

L'autophagie joue un rôle important dans le contrôle de la réplication intracellulaire des AIEC. En effet, l'infection par les AIEC active l'autophagie, notamment *via* le sidérophore yersiniabactine, limitant la réplication intracellulaire des AIEC tandis que dans des cellules où l'expression de *ATG16L1* ou *IRGM* est inhibée, ou si les cellules expriment le variant *ATG16L1*<sup>T300A</sup>, l'autophagie n'est plus fonctionnelle et les AIEC se répliquent au niveau intracellulaire (Dalmaso *et al.*, 2021; Lapaquette *et al.*, 2010). Aussi, il a été montré que les monocytes issus de patients atteints de MC porteurs du variant *ATG16L1*<sup>T300A</sup> ne parvenaient pas à éliminer les bactéries AIEC comparativement aux monocytes issus de patients portant l'allèle sauvage, renforçant l'importance d'*ATG16L1* dans le contrôle intracellulaire des AIEC (Sadaghian Sadabad *et al.*, 2015). L'infection par les AIEC active aussi une autre voie de l'autophagie EIF2AK4-EIF2A-ATF4 menant à l'élimination des bactéries et à une réponse inflammatoire contrôlée (Bretin *et al.*, 2016). Cette voie est diminuée dans des biopsies iléales de patients en phase active comparé à des biopsies de patients en phase quiescente. De plus, les souris déficientes pour *eif2ak4*<sup>-/-</sup> n'arrivent pas à activer l'autophagie dans les CEIs résultant en une colonisation intestinale par les AIEC et en une réponse inflammatoire augmentées chez ces animaux comparé aux souris sauvages (Bretin *et al.*, 2016).

Comme mentionnée précédemment, NOD2 va recruter *ATG16L1* au niveau du site d'entrée des bactéries ce qui permet d'activer l'autophagie et d'éliminer les bactéries intracellulaires. Lorsque *ATG16L1* ou *NOD2* sont mutés, ces effets sont perdus (Homer *et al.*, 2010; Travassos *et al.*, 2010). Dans des cellules surexprimant NOD2, l'infection par les AIEC mène à une plus forte expression de *ATG16L1* associée à une diminution de la survie des AIEC et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comparé aux cellules sauvages, soulignant l'étroite relation entre NOD2 et *ATG16L1* (Negroni *et al.*, 2016). Il a aussi été montré que l'infection par la souche AIEC LF82 dans des macrophages THP-1 activait l'autophagie, limitant ainsi la réplication intracellulaire des AIEC. Cependant, une altération de l'expression de *ATG16L1* ou *IRGM* dans des THP-1 ou de *NOD2* dans des macrophages péritonéaux issus de souris déficientes pour *NOD2* mène à une réplication intracellulaire des AIEC augmentée ainsi qu'à une augmentation de la sécrétion de TNF- $\alpha$  et IL-6 après infection avec les AIEC (Lapaquette *et al.*, 2012). Aussi, il est connu que l'incapacité des macrophages issus de patients à contrôler la réplication intracellulaire des AIEC est liée à des polymorphismes dans les gènes *ULK-1* et *IRGM* (Buisson *et al.*, 2019; Elliott *et al.*, 2015; Vazeille *et al.*, 2015). Ainsi, chez les patients atteints de MC, les AIEC pourraient tirer avantage d'une autophagie non fonctionnelle pour se répliquer au sein des macrophages et persister, favorisant la réponse inflammatoire.

Chez des souris déficientes pour *Ptpn2*, un gène impliqué dans l'autophagie connu pour réguler la réponse inflammatoire, la fonction barrière ainsi que les réponses immunitaires innées et adaptatives, une augmentation de l'abondance d'une nouvelle souche murine d'AIEC a été identifiée montrant que

*PTPN2* est important pour limiter l'expansion des AIEC (Scharl *et al.*, 2009; Shawki *et al.*, 2020; Spalinger *et al.*, 2016, 2018). Aussi, il a été démontré que *PTPN2* était nécessaire pour l'élimination des AIEC, la perte de *PTPN2* résultant en une augmentation de l'entrée des bactéries dans les macrophages et en une autophagie défectueuse couplée avec une acidification lysosomale anormale. De plus, les souris n'exprimant plus *Ptpn2* dans les cellules myéloïdes sont plus sensibles à l'infection par les AIEC (Spalinger *et al.*, 2022).

Les polymorphismes dans les gènes *ATG16L1* et *NOD2* associés à la MC entraînent chez les patients des défauts au niveau de l'assemblage et de la sécrétion des peptides antimicrobiens dans les cellules de Paneth, avec notamment une réduction de la sécrétion de défensines (Cadwell *et al.*, 2008, 2010; Stappenbeck & McGovern, 2017; Wehkamp *et al.*, 2004, 2005). Chez les souris, des observations similaires ont été faites, des altérations dans les gènes *Atg16l1*, *Nod2*, *Lrrk2* ou *Irgm1* résultant en une réduction de l'expression et de la sécrétion de peptides antimicrobiens (Stappenbeck & McGovern, 2017). Il a été observé que les patients atteints de MC exprimaient moins l' $\alpha$ -défensine 5 (HD5). Il a également été mis en évidence dans un modèle *ex vivo* que la translocation de la souche AIEC LF82 était augmentée au niveau de l'épithélium associé au follicule des patients atteints de MC comparé aux contrôles (Alkaissi *et al.*, 2020). L'incubation des tissus avec HD5 réduisait la translocation des AIEC démontrant que les défensines sont importantes pour réguler la colonisation intestinale par les AIEC. Toutefois, il faut noter que certaines souches AIEC sont résistantes aux peptides anti-microbiens grâce aux gènes *ar1A* et *ar1C*, ce qui leur permet de survivre au niveau intestinal (Cho *et al.*, 2022; McPhee *et al.*, 2014).

#### **- Impact d'une infection par les AIEC sur le microbiote**

Les bactéries AIEC peuvent négativement impacter le microbiote intestinal. Dans le modèle TLR5 KO (souris déficientes pour le récepteur Toll-like 5, reconnaissant la flagelline bactérienne), des souris axéniques ont été infectées avec la souche AIEC de référence LF82 avant d'être placées dans un environnement classique permettant l'implantation d'un microbiote complexe. L'infection des souris résultait en une inflammation intestinale chronique associée à une altération de la composition du microbiote intestinal, caractérisée notamment par une baisse de la diversité des espèces et par une augmentation de son potentiel pro-inflammatoire (Chassaing *et al.*, 2014). De même, chez des souris TLR5 KO possédant le microbiote restreint « Altered Schaedler Flora », l'infection avec des AIEC entraînait des altérations de la composition du microbiote associées à des niveaux plus élevés de LPS et de flagelline (Chassaing & Gewirtz, 2018). De plus, des altérations de la composition du microbiote ont aussi été observées suite à une infection par les AIEC chez des souris *eif2ak4<sup>-/-</sup>* (Bretin *et al.*, 2018). Dans une étude récente, il a été démontré que chez des souris avec une colite induite au DSS, l'infection avec les AIEC exacerbait la dysbiose et rendait les souris résistantes à la restauration du microbiote suite à une transplantation fécale (Zhilu *et al.*, 2021). De plus, dans une cohorte chinoise, la présence des

**Table 2 : Modèles d'étude de la physiopathologie des AIEC *in vivo*.**

	Modèle	Caractéristiques du modèle	En contexte d'infection par les AIEC	Réf
Modèles murins	CEABAC10 (Chan and Stanners, 2004) + antibiotiques	Souris portant un transgène qui permet l'expression colique de <i>CEACAM6</i> + streptomycine 20 mg/souris en gavage intragastrique pour déstabiliser le microbiote + DSS 0,25%	Persistance des AIEC au niveau intestinal + induction d'une colite sévère vs souris sauvages	Carvalho <i>et al.</i> , 2009
	Streptomycine (Small <i>et al.</i> , 2013)	Streptomycine 20 mg/souris en gavage intragastrique pour déstabiliser le microbiote	Mise en place d'une infection chronique par les AIEC entraînant une inflammation chronique et de la fibrose	Small <i>et al.</i> , 2013
	Antibiotiques (Oberc <i>et al.</i> , 2018)	Traitement des souris avec de la streptomycine, vancomycine avant infection avec les AIEC ; traitement de souris infectées avec les AIEC avec de la vancomycine	Colonisation intestinale par les AIEC favorisée ; expansion des bactéries AIEC suite au traitement avec la vancomycine	Oberc <i>et al.</i> , 2018
	DSS (Okayasu <i>et al.</i> , 1990)	DSS, sucre sulfaté qui entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale, résultant au développement d'une colite	Aggravation de la colite suite à l'infection par la souche AIEC LF82 + exacerbation de la fibrose chez les souris ayant reçu le DSS	Carvalho <i>et al.</i> , 2008 ; Chokr <i>et al.</i> , 2021 ; Imai <i>et al.</i> , 2019
	IL10 KO (Kuhn <i>et al.</i> , 1993)	Pas de production d'IL10 + Développement spontané d'une colite	Exacerbation de la colite suite à l'infection par la souche AIEC LF82	Guo <i>et al.</i> , 2018
	Axénique IL10 KO (Sellon <i>et al.</i> , 1993)	Pas de production d'IL10	Induction d'une inflammation intestinale chronique chez les souris seulement colonisées avec des AIEC	Schmitz <i>et al.</i> , 2019
	<i>eif2ak4</i> <sup>-/-</sup> (Bretin <i>et al.</i> , 2016)	Autophagie non fonctionnelle	Augmentation de la colonisation intestinale par les AIEC et de la réponse inflammatoire chez les souris transgéniques vs souris sauvages	Bretin <i>et al.</i> , 2016
	<i>Ptpn2</i> -LysMCre (Spalinger <i>et al.</i> , 2018)	Souris n'exprimant pas <i>PTPN2</i> dans les cellules myéloïdes	Souris plus sensibles à l'infection vs <i>Ptpn2</i> <sup>fl/fl</sup> : plus forte colonisation dans les fèces, translocation bactérienne, présence des AIEC dans les macrophages de la <i>lamina propria</i> , inflammation modérée	Spalinger <i>et al.</i> , 2022
	<i>NOD2</i> <sup>-/-</sup> (Barreau <i>et al.</i> , 2007)	Développement/fonction anormal(e) des plaques de Peyer caractérisé par une réponse immunitaire exagérée et une augmentation de la perméabilité	Plus forte interaction des AIEC avec les plaques de Peyer des souris <i>Nod2</i> <sup>-/-</sup> vs souris sauvages	Chassaing <i>et al.</i> , 2011
	TLR5 KO (Vijay-Kumar <i>et al.</i> , 2007)	Développement spontané d'une colite	Induction d'une inflammation intestinale chronique chez des souris axéniques + altérations de la composition du microbiote	Chassaing <i>et al.</i> , 2014 ; Chassaing and Gewirtz, 2018
	Infection par <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium (Grassl <i>et al.</i> , 2008)	Induction d'une colite et d'une fibrose intestinale sévère et persistante	Colonisation intestinale stable des AIEC, aggravation de l'inflammation intestinale et favorisation de la fibrose	Imai <i>et al.</i> , 2019
	Stress psychologique (Shaler <i>et al.</i> , 2021)	Colonisation par les AIEC pendant 5 jours avant de soumettre les souris à un stress durant la nuit (souris dans un espace restreint)	Exposition à un stress aigu favorise l'expansion des AIEC, exposition à un stress chronique mène à une perte du contrôle des AIEC chez l'hôte	Shaler <i>et al.</i> , 2021
	Co-infection AIEC + <i>Salmonella</i> Typhimurium / <i>Citrobacter rodentium</i> (Small <i>et al.</i> , 2016)	Streptomycine 20 mg/souris en gavage intragastrique + infection avec les AIEC, 2 semaines après infection avec <i>Salmonella</i> Typhimurium / <i>Citrobacter rodentium</i>	Gastroentérite aiguë engendrée par <i>Salmonella</i> Typhimurium favorise l'expansion des AIEC, colonisation antérieure par les AIEC aggrave la réponse inflammatoire et l'évolution de la maladie. Colite induite par <i>C. rodentium</i> retarde l'élimination des AIEC + AIEC retarde la guérison de la muqueuse suite à la colite	Small <i>et al.</i> , 2016
Autres modèles	<i>Caenorhabditis elegans</i>		Réduction de près de 50% de la durée de vie des nématodes infectés avec la souche AIEC LF82 vs souche OP50	Simonsen <i>et al.</i> , 2011
	Zebrafish		Colonisation intestinale par les AIEC, induction de lésions intestinales et d'une inflammation intestinale	Rag <i>et al.</i> , 2022

AIEC au niveau iléal était corrélée avec une dysbiose plus sévère du microbiote associé à la muqueuse chez les patients atteints de MC, avec notamment une diminution de la diversité et une plus faible abondance des *Firmicutes* (Zhilu *et al.*, 2021). Il a récemment été montré que chez les patients atteints de MC, la colonisation par les AIEC était associée avec une signature spécifique du microbiote, caractérisée par une augmentation de l'abondance de *Ruminococcus gnavus* (Buisson *et al.*, 2022). L'ensemble de ces observations montre que la colonisation intestinale par les bactéries AIEC peut avoir un effet sur la composition globale du microbiote intestinal et pourrait participer au développement et au maintien de la MC.

#### - *Modèles d'étude des AIEC dans la physiopathologie de la MC in vivo*

Pour pouvoir étudier le rôle des AIEC dans la physiopathologie de la MC *in vivo*, il faut pouvoir obtenir une colonisation intestinale par ces bactéries. Il faut ainsi utiliser des modèles murins particuliers pour obtenir cette colonisation, les AIEC ne persistant qu'à un faible niveau dans l'intestin de souris sauvages non traitées par des antibiotiques ou par du DSS. Parmi les modèles d'études, le modèle CEABAC10 est le plus couramment utilisé, notamment au laboratoire M2iSH. Le génome murin ne possède pas d'orthologue au gène humain *CEACAM6* ce qui empêche de reproduire l'interaction AIEC/*CEACAM6 in vivo*. Le modèle CEABAC10 (« Carcinoembryonic antigen bacterial artificial chromosome 10 ») a ainsi été développé il y a plusieurs années (Chan & Stanners, 2004). Dans ce modèle, les souris portent un transgène codant pour 4 gènes appartenant à la famille *CEACAM*, dont *CEACAM6*. Le transgène utilisé, présent en 10 copies, est sous le contrôle du promoteur humain, menant à une expression de *CEACAM6* uniquement au niveau du côlon, où *CEACAM6* est exprimé physiologiquement chez l'Homme. Dans ce modèle, il a été démontré que les AIEC étaient capables de coloniser la muqueuse des souris, *via* l'interaction *CEACAM6*/FimH, et également d'induire une réponse inflammatoire (Carvalho *et al.*, 2009).

D'autres modèles murins permettent d'étudier l'interaction des AIEC avec la muqueuse intestinale, certains ayant été cités précédemment comme le modèle DSS ou IL-10 KO (**Table 2**). En plus des modèles murins, de nouveaux modèles d'infection sont maintenant disponibles, ces modèles faisant appel à des organismes tels que *Caenorhabditis elegans* ou le zebrafish.

Même s'il ne s'agit pas d'un mammifère et que son système immunitaire plus simple ne comprend que des mécanismes innés, *C. elegans* est un organisme simple qui se multiplie rapidement faisant de lui un modèle intéressant. Simonsen et collaborateurs ont été les premiers à étudier l'effet de l'infection par la souche AIEC LF82 sur *C. elegans*. Comparé à la souche non pathogène d'*E. coli* OP50, l'exposition à la souche AIEC LF82 résultait en une réduction de près de 50% de la durée de vie médiane des nématodes, ce phénotype étant dépendant du gène *hfq* de la souche LF82 (Simonsen *et al.*, 2011). Dans une étude récente, la virulence des souches AIEC comparativement à des souches d'*Escherichia*



*coli* non-AIEC a été étudiée dans le modèle *C. elegans*. Il a été observé que l'infection avec les différentes souches d'*E. coli* impactait la survie de *C. elegans* d'une manière souche spécifique. Cependant, ils n'ont pas réussi à démontrer de corrélation entre la durée de vie des nématodes infectés et la virulence ou la capacité des AIEC à envahir des cellules épithéliales intestinales. Il est suggéré que ce modèle pourrait être relevant pour le criblage de molécules anti-adhésives et de probiotiques limitant l'invasion (de Sousa Figueiredo *et al.*, 2021).

Un modèle zebrafish a récemment été développé pour étudier l'infection par les AIEC. Dans ce modèle, les AIEC sont incubés dans l'eau avec les poissons. Les AIEC colonisent l'intestin des poissons induisant des lésions intestinales ainsi qu'une inflammation intestinale. Il a également été démontré que la souche probiotique *E. coli* Nissle 1917 permettait de réduire la colonisation par les AIEC, les lésions tissulaires ainsi que la réponse pro-inflammatoire observée chez les zebrafish infectés (Nag *et al.*, 2022). Même si c'est un modèle facile à utiliser et à mettre en œuvre, les principales limitations sont que l'intestin du zebrafish présente des différences anatomiques avec celui de l'Homme, et qu'il est difficile de collecter les échantillons de fèces et d'étudier les protéines sécrétées dans l'eau.

Toutes ces études explorant le rôle du microbiote intestinal et de certaines bactéries dans la MC montrent qu'il ne s'agit pas d'une maladie infectieuse à proprement parler, il n'y a pas de micro-organisme pathogène spécifiquement associée à la MC. L'implication des facteurs microbiens est plus complexe et implique des bactéries pathobiontes telles que les AIEC. Les AIEC n'impactent pas négativement l'hôte en condition homéostasique, des sujets sains étant porteurs de ces bactéries. Toutefois, elles vont pouvoir profiter d'une modification de l'environnement intestinal comme d'une dysbiose par exemple, pour induire/exacerber l'inflammation intestinale.

*Au cours de ma thèse, nous avons écrit une revue portant sur les AIEC. Elle détaille notamment les interactions entre les AIEC et les cellules épithéliales intestinales et immunitaires, présente les facteurs environnementaux et génétiques qui favorisent leur implantation intestinale et décrit le mode de vie de ces bactéries dans la lumière intestinale. Vous trouverez cette revue de la littérature dans le manuscrit, à la fin de la partie « Étude bibliographique » (Chervy *et al.*, 2020).*

### 3. Facteurs environnementaux impliqués dans l'étiologie de la MC

Le rôle de l'environnement dans l'étiologie de la MC est supporté par plusieurs arguments épidémiologiques : (i) une augmentation de l'incidence de la MC dans différents pays nouvellement industrialisés et qui ont adoptés un mode de vie occidental, avec notamment une alimentation enrichie en sucres, en gras et appauvrie en fibres, (ii) une augmentation de l'incidence de la MC en une ou deux générations chez les migrants ayant quittés une région avec une faible prévalence de MC pour rejoindre une région avec une forte prévalence (Fiorino *et al.*, 2021; Kaplan & Ng, 2016; Ng *et al.*, 2017; Tsironi *et al.*, 2004). De plus, l'étude menée sur les jumeaux monozygotes a montré que la concordance pour la MC était seulement comprise entre 20 et 50%, indiquant que d'autres facteurs, comme des facteurs environnementaux, étaient impliqués dans le développement de la MC (Halfvarson *et al.*, 2003; Orholm *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 1996).

#### a. Le tabac

Le tabagisme a été le premier facteur de risque environnemental associé à la MC. En effet, plusieurs études ont montré l'association positive entre tabagisme et MC (Hlavaty *et al.*, 2013; Mahid *et al.*, 2006). Aussi, chez les patients atteints de MC, les fumeurs ont plus de complications intestinales, subissent plus de rechutes cliniques et d'opérations chirurgicales et présentent une moindre réponse aux traitements que les patients non-fumeurs (Cosnes, 2010; Picco & Bayless, 2003; Sutherland *et al.*, 1990; To *et al.*, 2016). En plus d'augmenter le risque de développer la MC, des études ont montré que le tabagisme favorisait la progression de la MC d'un phénotype B1 inflammatoire vers un phénotype B2/B3 sténosant/pénétrant (Lakatos *et al.*, 2013; Nunes *et al.*, 2013). La réduction de la fréquence de tabagisme n'impacte pas les signes cliniques. Toutefois, il a été démontré que les patients arrêtant de fumer pendant plus d'un an présentaient une maladie moins sévère que ceux n'ayant pas arrêté et l'arrêt de la cigarette est associé à un moindre risque de rechute (Cosnes *et al.*, 2001; Higuchi *et al.*, 2012; Seksik *et al.*, 2009). Le mécanisme privilégié serait lié à des changements au niveau du microbiote intestinal et du système immunitaire induits par le tabagisme (Bergeron *et al.*, 2012; Verschuere *et al.*, 2011). En effet, une diminution de la diversité bactérienne a été observée chez les fumeurs comparé aux non-fumeurs (Shanahan *et al.*, 2018). Les espèces *Bacteroides-Prevotella* et *F. prausnitzii* étaient respectivement plus et moins retrouvées chez les fumeurs vs les non-fumeurs (J. L. Benjamin *et al.*, 2012). Une étude récente a révélé un lien entre le tabagisme et le variant ATG16L1 T300A dans l'altération de la fonction des cellules de Paneth chez les patients atteints de MC ainsi que dans un modèle murin possédant la mutation, l'interaction entre ces 2 facteurs favorisant les défauts dans les cellules de Paneth (T.-C. Liu *et al.*, 2018).

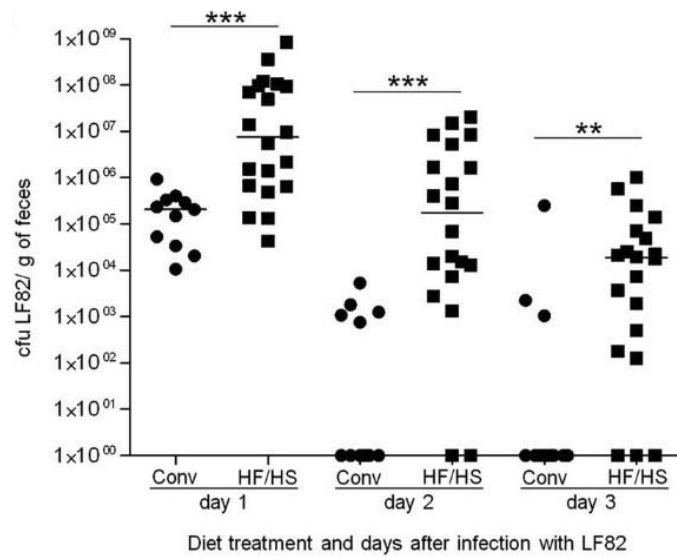
## **b. Régime alimentaire**

### **i. Régime riche en graisses, en sucres et pauvres en fibres**

Un des principaux facteurs environnementaux impliqué dans l'étiologie de la MC est le régime alimentaire, et plus particulièrement, la consommation d'un régime de type occidental. Ce « Western diet », riche en graisses, en acides gras polyinsaturés n-6, en sucres, en protéines animales et appauvri en fibres, favoriserait la survenue de la MC (Chiba *et al.*, 2019; Gill *et al.*, 2022; Lo *et al.*, 2020). En effet, une étude récente a montré que ce type de régime était associé avec un risque accru de développer la MC (Peters *et al.*, 2022). Les fruits et les légumes joueraient un rôle protecteur dans le développement de la MC *via* les fibres qu'ils contiennent. Une étude prospective a montré que la consommation sur le long terme de fibres (particulièrement issues de fruits) était associée à un risque plus faible de développer la MC (Ananthakrishnan *et al.*, 2013). Cela serait dû à la métabolisation des fibres par le microbiote intestinal, menant à la production d'AGCC, connus pour avoir des effets anti-inflammatoires et renforçant la barrière intestinale (C. J. Kelly *et al.*, 2015; Z. Zhang *et al.*, 2022).

La consommation d'un régime « Western diet » augmente la perméabilité intestinale et favorise le développement d'une inflammation intestinale à bas bruit ce qui pourrait expliquer son impact négatif sur le développement de la MC (Christ *et al.*, 2019; Malesza *et al.*, 2021; Rohr *et al.*, 2020). De plus, la consommation d'un régime alimentaire occidentalise le microbiote. Une étude a montré l'impact d'un changement de régime alimentaire et de style de vie sur le microbiote intestinal. Des individus en provenance de Thaïlande (pays non occidentalise) ayant migrés vers les États-Unis présentaient un microbiote moins divers et fonctionnellement impacté, avec un remplacement des souches *Prevotella* par des souches *Bacteroides*, comparativement aux individus vivant en Thaïlande (Vangay *et al.*, 2018). Aussi, une étude comparant le microbiote intestinal d'enfants européens consommant un régime occidentalise avec celui d'enfants africains dont le régime est majoritairement végétarien et riche en fibres, a montré que le microbiote des 2 populations était différent : le microbiote des enfants africains était enrichi en bactéries du genre *Prevotella* et *Xylanibacter* alors que celui des européens était enrichi en *Enterobacteriaceae* (De Filippo *et al.*, 2010). De plus, le microbiote des personnes suivant un régime enrichi en protéines animales présentait une augmentation de l'abondance en bactéries résistantes aux acides biliaires telles que *Alistipes*, *Bilophila* et *Bacteroides* ainsi qu'une réduction d'espèces appartenant aux *Firmicutes* métabolisant les fibres, comparativement au microbiote des personnes suivant un régime enrichi en fruits, légumes et fibres (David *et al.*, 2014).

Des modèles animaux ont permis de révéler l'influence d'une nourriture riche en sucres et en graisses sur la composition du microbiote intestinal, avec notamment une augmentation du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* et des Protéobactéries (Bisanz *et al.*, 2019; Hildebrandt *et al.*, 2009; R. P. Singh *et al.*, 2020; Taira *et al.*, 2015; Turnbaugh *et al.*, 2009). Une modification de la composition du microbiote chez ces animaux entraîne une légère inflammation intestinale associée à une augmentation



**Figure 49 : Le régime High fat/High sugar (HF/HS) favorise la colonisation intestinale par les AIEC.**

La colonisation intestinale par les AIEC a été suivie dans les fèces des souris sous régime conventionnel ou HF/HS durant 3 jours après l'infection avec la souche AIEC LF82. Significativement plus de bactéries ont été dénombrées dans les fèces des souris sous régime HF/HS comparativement aux souris contrôles (d'après Martinez-Medina *et al.*, 2014).

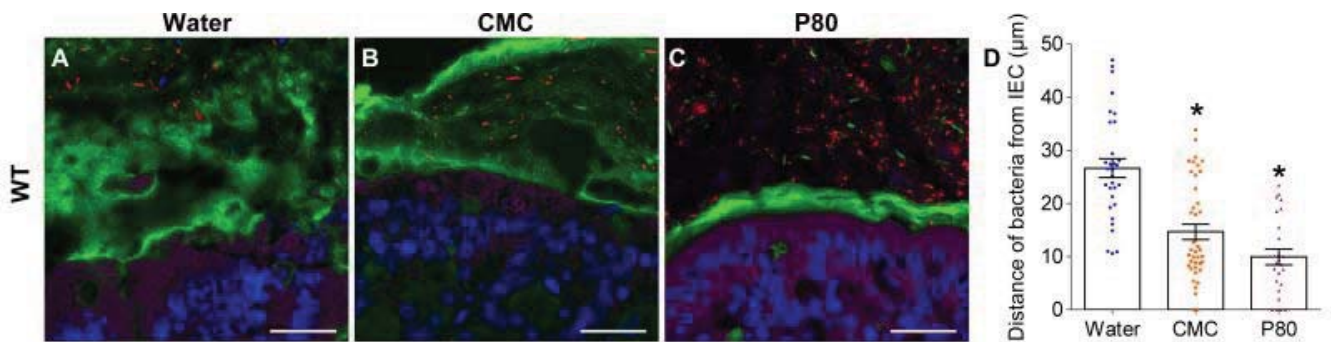
CFU : Colony Forming Unit.

de la perméabilité intestinale et certains troubles métaboliques (Cani *et al.*, 2008; A. M. F. Johnson *et al.*, 2015). Aussi, différentes études ont montré qu'un régime alimentaire riche en graisses et en sucres induisait une inflammation, l'exacerbant dans le modèle de souris présentant une iléite, conséquence d'une augmentation de la perméabilité intestinale caractérisée par une diminution de l'expression de la protéine de jonction occludine (Gruber *et al.*, 2013; K.-A. Kim *et al.*, 2012). De plus, l'apport accru en graisses animales saturées engendre une augmentation de la production et de la sécrétion de taurocholate, acide biliaire augmentant la disponibilité en sulfate utilisable par *Bilophila wadsworthia*. Il a été démontré que la multiplication exagérée de cette bactérie dans le tube digestif était associée au développement d'une colite chez des animaux IL-10 KO (Devkota *et al.*, 2012; Sartor, 2012). Dans le modèle CEABAC10, la consommation d'un régime enrichi en graisses et en sucres (HF/HS) par les souris augmente la perméabilité intestinale, diminue l'épaisseur de la couche de mucus et induit une dysbiose caractérisée par une augmentation de la population de *E. coli*, ainsi qu'une diminution de la production d'AGCC. En plus d'induire une inflammation intestinale de bas grade, le régime HF/HS favorise la colonisation intestinale par les AIEC d'une manière microbiote-dépendante (**Figure 49**) (Agus *et al.*, 2016; Martinez-Medina *et al.*, 2014). Les altérations du microbiote engendrées par le « Western diet » altèrent aussi la fonction des cellules de Paneth avec une diminution de l'expression de peptides antimicrobiens, diminuent la formation de la couche de mucus et augmentent sa pénétrabilité (c'est-à-dire que les bactéries peuvent entrer dans la couche de mucus) (X. Guo *et al.*, 2017; T.-C. Liu *et al.*, 2021; B. O. Schroeder *et al.*, 2018). Chez des souris colonisées par un microbiote humain, un régime pauvre en fibres favorise l'expansion de bactéries dégradant le mucus menant à l'érosion de la couche de mucus protectrice et augmentant la susceptibilité à l'infection par des pathogènes (Desai *et al.*, 2016).

Ainsi, des interventions nutritionnelles pourraient être bénéfiques pour la prise en charge des patients atteints de MC. Les résultats d'une récente étude appuient cette hypothèse puisque des patients atteints de MICI ayant suivi un régime alimentaire pauvre en sucres fermentescibles durant 4 semaines ont montré un soulagement de leurs symptômes intestinaux améliorant leur qualité de vie (Cox *et al.*, 2020).

## ii. Additifs alimentaires

Des produits transformés sont présents dans le « Western diet », et leur consommation est positivement associée à un risque de développer la MC (Narula *et al.*, 2021). Ils contiennent de nombreux additifs alimentaires comme les émulsifiants alimentaires ou la maltodextrine. Des corrélations positives ont été démontrées entre la consommation d'émulsifiants et l'incidence de la MC en Europe, Amérique du Nord et au Japon (C. L. Roberts *et al.*, 2013). Notamment, le carboxyméthylcellulose (CMC) et le polysorbate 80 (P80), émulsifiants alimentaires fréquemment retrouvés dans les produits transformés pour améliorer la texture et prolonger leur durée de conservation,



**Figure 50 : Impact des émulsifiants alimentaires sur la localisation du microbiote intestinal.**

**A-C : Analyse par microscopie confocale de la localisation du microbiote intestinal.** Le mucus est marqué en vert (Muc2), l'actine en violet, les bactéries en rouge et l'ADN en bleu.

**D : Distances entre les bactéries et les cellules épithéliales intestinales en fonction des conditions.**

Les clichés de microscopie montrent qu'en situation physiologique (A), les bactéries sont à distance de l'épithélium intestinal (environ 25 µm). Cependant, chez les souris ayant reçu des émulsifiants alimentaires (B, C), une réduction de la distance entre les bactéries et l'épithélium d'environ 50 % est observée (D). Cet empiètement du microbiote intestinal dans le mucus corrèle avec une réduction de l'épaisseur de la couche de mucus (d'après Chassaing *et al.*, 2015).

CMC : Carboxyméthylcellulose, P80 : Polysorbate 80.



induisent des altérations de la composition du microbiote intestinal humain *ex vivo* et *in vivo* (Chassaing *et al.*, 2017, 2022; Naimi *et al.*, 2021). Chassaing et collaborateurs a démontré que l'administration de CMC ou de P80 à des souris entraînait une invasion de la couche de mucus par le microbiote intestinal ainsi que des altérations de la composition du microbiote, caractérisées par une augmentation de son potentiel pro-inflammatoire (**Figure 50**). De plus, les animaux traités avec les émulsifiants développaient une inflammation intestinale, de bas grade chez des souris sauvages ou sévère chez des souris prédisposées génétiquement (Chassaing *et al.*, 2015; Viennois & Chassaing, 2018). Concernant l'impact de la consommation du CMC chez l'Homme, des individus sains ont soit suivi un régime alimentaire dépourvu d'émulsifiants, soit un régime enrichi en CMC (15g/jour) durant 11 jours. Comparativement aux sujets contrôles, la consommation de CMC résultait en une perturbation de la composition du microbiote intestinal et entraînait des modifications du métabolome fécal avec une réduction de métabolites bénéfiques pour la santé tels que les AGCC et les acides aminés libres. De plus, 2 individus sous régime enrichi en CMC présentaient une invasion du mucus par le microbiote intestinal (Chassaing *et al.*, 2022). De manière intéressante, il a été montré que le CMC et le P80 pouvaient directement impacter le comportement des AIEC, l'exposition des bactéries aux émulsifiants induisant l'expression de gènes de virulence et augmentant leur motilité et leur capacité à adhérer à des cellules épithéliales en culture (Viennois *et al.*, 2020).

Concernant la maltodextrine, son rôle négatif dans la défense antimicrobienne au sein de l'intestin est connu (Nickerson *et al.*, 2015). Notamment, il a été démontré dans un modèle murin que cet épaississant augmentait le stress du réticulum endoplasmique dans les cellules épithéliales de l'intestin, induisant une réduction de la production de mucus et augmentant la susceptibilité à la colite (Laudisi *et al.*, 2019). De plus, *in vitro*, il a été observé que l'exposition des AIEC à la maltodextrine induisait l'expression des pili de type I, favorisant la formation de biofilm par la souche AIEC LF82 et l'adhésion bactérienne aux CEIs en culture (Nickerson & McDonald, 2012). Ainsi la consommation d'additifs alimentaires pourrait promouvoir un environnement intestinal pro-inflammatoire *via* des altérations du microbiote intestinal et au niveau de la couche de mucus, favorisant ainsi la colonisation intestinale par des espèces pro-inflammatoires telles que les AIEC.

### **c. Autres facteurs environnementaux**

#### **i. Activité physique**

Les patients diagnostiqués sont généralement physiquement moins actifs que la population générale (Gatt *et al.*, 2019; van Langenberg *et al.*, 2015). D'après une étude de Khalili et collaborateurs, les femmes actives voient leur risque de développer la MC diminué de 44% comparativement aux femmes sédentaires (Khalili *et al.*, 2013). En plus d'améliorer la qualité de vie, la santé psychologique, le statut nutritionnel ou la densité osseuse, la pratique d'une activité physique serait bénéfique pour les patients car elle participe à la réduction de l'inflammation (Bilski *et al.*, 2014; Khalafi & Symonds,

2020). Dans des modèles *in vivo* d'inflammation, il a été observé un effet anti-inflammatoire de l'activité physique (Bilski *et al.*, 2015; Mazur-Bialy *et al.*, 2017; Saxena *et al.*, 2012). Dans le modèle CEABAC10 infecté avec les bactéries AIEC, il a été montré que l'activité physique spontanée augmentait l'expression des protéines de jonctions serrées, modulait positivement le microbiote intestinal et augmentait la production d'AGCC, ce qui réduirait l'inflammation intestinale (Maillard *et al.*, 2019). Une autre étude a montré que l'association de l'activité physique avec de l'huile de lin avait aussi des impacts positifs sur la composition du microbiote et la production de butyrate (Plissonneau *et al.*, 2022). Il est à noter que les patients avec une maladie peu active sont ceux pratiquant une plus forte activité physique (Lamers *et al.*, 2021). Ainsi, la mise en place de programmes d'activité physique apparaît comme une stratégie thérapeutique complémentaire attractive pour maximiser les périodes de rémissions et améliorer la qualité de vie chez les patients atteints de MC.

### **ii. La vitamine D**

Une association entre des polymorphismes dans le gène codant pour le récepteur de la vitamine D (VDR) et la susceptibilité de développer la MC a été démontrée (L.-N. Xue *et al.*, 2013). Une étude prospective de grande envergure a conclu à une diminution du risque de développer la MC chez les femmes présentant un haut niveau plasmatique de 25-hydroxy vitamin D. De plus, des patients avec une forme active de la MC présentaient des niveaux sériques de vitamines D plus faibles comparés aux patients en rémission (Ananthakrishnan *et al.*, 2012; Ham *et al.*, 2014). La vitamine D jouerait un rôle anti-inflammatoire (Cantorna, 2010; Kamen & Tangpricha, 2010). En effet, une exacerbation de la colite induite au DSS a été observée chez des souris déficientes pour VDR ou présentant une déficience en vitamine D (Froicu & Cantorna, 2007; Lagishetty *et al.*, 2010). Une autre étude a montré qu'une déficience en vitamine D prédisposait à la dysfonction de la barrière intestinale induite par les AIEC (Assa *et al.*, 2015).

### **iii. Autres facteurs environnementaux**

Enfin, il semblerait que d'autres facteurs environnementaux tels que la prise d'antibiotiques dans les premières années de vie, l'allaitement, la pollution atmosphérique ou encore le stress psychologique *via* l'axe cerveau-intestin-microbiote soient impliqués dans le développement et/ou la progression de la MC (S. Ding *et al.*, 2022; Kaplan *et al.*, 2010; Kronman *et al.*, 2012; Sgambato *et al.*, 2017; R. Ungaro *et al.*, 2014).

Plusieurs facteurs environnementaux semblent impliqués dans la pathogenèse de la MC. Cependant, les mécanismes sous-jacents ne sont pas toujours clairement identifiés démontrant que d'autres études sont nécessaires pour comprendre au mieux l'impact de l'environnement sur le développement/le maintien de la MC. Les facteurs environnementaux peuvent aussi interagir avec des facteurs génétiques, épigénétiques et microbiens chez l'Homme rendant difficiles les études qui pourraient valider le rôle causal de chacun de ces facteurs.

#### 4. Épigénétique et maladie de Crohn

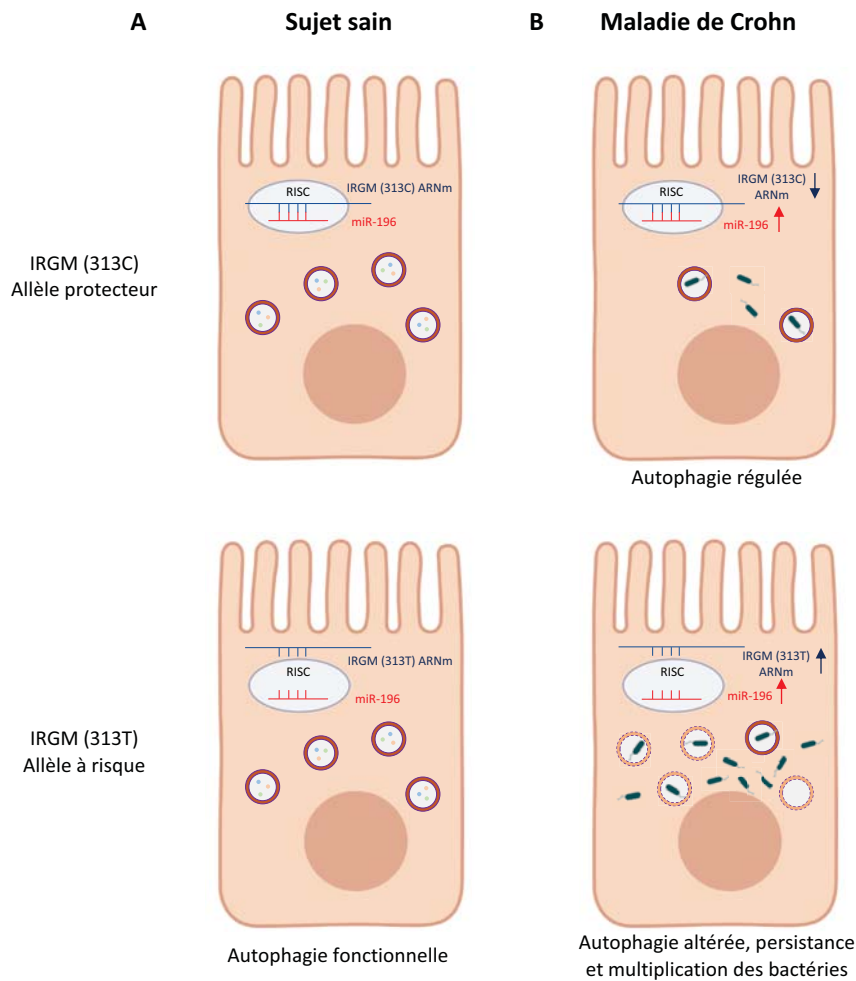
L'épigénétique est devenue un domaine prometteur pour la recherche de nouveaux biomarqueurs, pour améliorer le diagnostic, le pronostic et la réponse aux traitements dans les maladies. Ainsi, une attention nouvelle est maintenant portée sur les facteurs épigénétiques afin de mieux comprendre les modifications de l'expression des gènes et les mécanismes moléculaires impliqués dans la MC.

##### a. ARNs non codants et maladie de Crohn

###### i. Expression des miARNs chez les patients atteints de MC

Une première étude a montré une expression modifiée (augmentée ou diminuée) de miARNs dans la muqueuse colique de patients atteints de MC vs des individus sains (Fasseu *et al.*, 2010). Lors de leur analyse, ils ont également observé que l'expression des miARNs variait en fonction de l'activité de la MC. Une modification de l'expression de miARNs a aussi été observée dans des biopsies iléales ou coliques ainsi que dans des cellules sanguines issues de patients atteints de MC comparativement à des échantillons d'individus contrôles (F. Wu *et al.*, 2010, 2011). Depuis, plusieurs études se sont intéressées à l'expression des miARNs chez des patients atteints de MC identifiant de nombreux miARNs dérégulés (James *et al.*, 2020). Par exemple, il a été observé que l'expression de miR-233 était significativement augmentée dans la muqueuse colique des patients atteints de MC et son niveau d'expression corrélait avec l'activité de la maladie (H. Wang, Zhang, *et al.*, 2016). De manière intéressante, parmi les 190 miARNs identifiés comme associés à la MC, 26 d'entre eux régulaient spécifiquement l'expression d'enzymes impliquées dans les modifications épigénétiques, les miARNs hsa-miR-192-5p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-1, hsa-miR-101-3p et hsa-miR-375 étant par exemple impliqués dans la régulation de l'expression des gènes *DNMT3A* et *DNMT3B* qui contrôlent la méthylation de l'ADN (Fernández-Ponce *et al.*, 2021).

D'un point de vue fonctionnel, les miARNs régulent la barrière intestinale, l'inflammation ou encore l'autophagie, ce qui en fait des acteurs importants dans la physiopathologie de la MC (H. Jung *et al.*, 2021; Kalla *et al.*, 2015). Par exemple, miR-223, surexprimé chez les patients atteints de MC, cible la claudine-8, altérant la fonction barrière de l'intestin tandis que miR-155, également surexprimé



**Figure 51 : Modèle hypothétique de l'implication du variant IRGM (c.313C>T) dans l'autophagie, l'élimination des bactéries et la maladie de Crohn (MC).**

**A : Chez un sujet sain.** Le micro-ARN 196 (miR-196) cible normalement l'ARNm *IRGM*. Le variant à risque *IRGM* (c.313C>T) ne possède plus le site de fixation pour le miR-196 et n'est donc plus régulé par celui-ci. Ce variant ne cause pas d'altération au niveau de l'autophagie chez un individu sain.

**B : Chez un patient atteint de MC.** L'expression de miR-196 est augmentée, ce qui mène à la diminution de l'expression d'*IRGM* et par conséquent, à la diminution du flux autophagique et à une diminution des bactéries intracellulaires associées aux autophagosomes (panel du haut). Chez les sujets présentant le variant de risque, l'expression d'*IRGM* n'est pas inhibée par miR-196 et est donc plus exprimée, menant à une autophagie défectueuse associée à une diminution du pourcentage de bactéries intracellulaires capturées par des vacuoles acides fonctionnelles (cercles oranges). La réplication de la majorité des bactéries se fait dans des vacuoles non matures (cercles en pointillés) conduisant à la persistance des bactéries, ce qui pourrait aggraver l'inflammation chronique observée chez les patients (adaptée de Nguyen *et al.*, 2013).

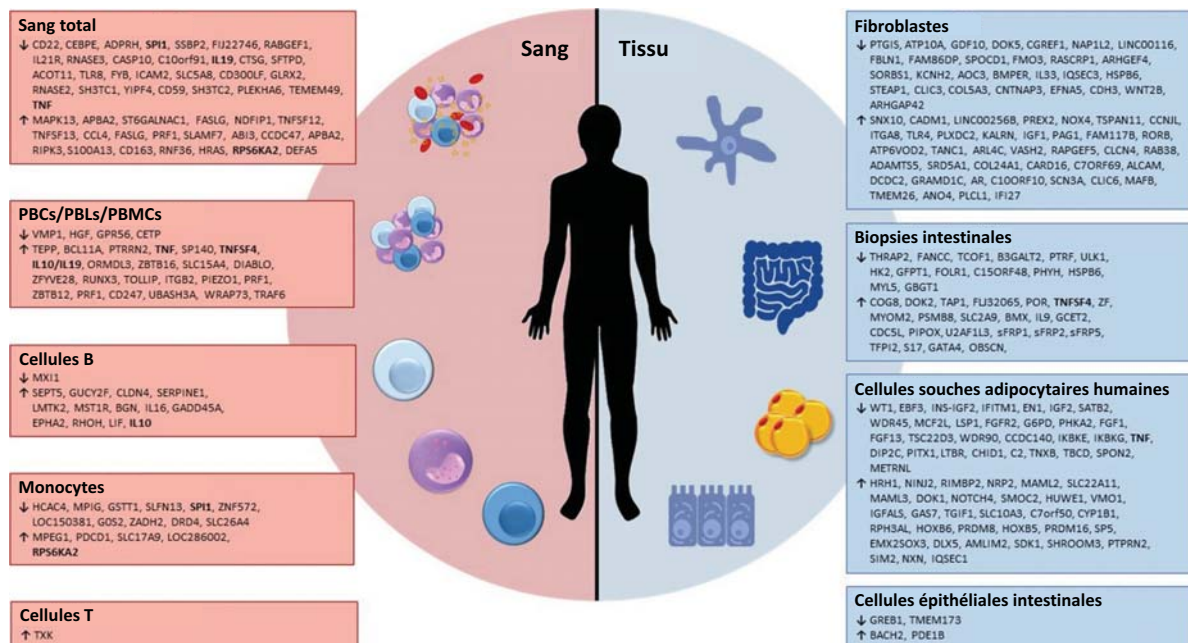
RISC : RNA-Induced Silencing Complex.

chez les patients, altère l'expression de SHIP-1 favorisant la colite induite au DSS chez les souris (Béres *et al.*, 2016; Z.-J. Lu *et al.*, 2017; Svrcek *et al.*, 2013; H. Wang, Chao, *et al.*, 2016). Aussi, la mutation associée à la MC présente en 3'UTR de l'ARNm codant pour l'IL-23R entraîne une perte de fixation des miARNs let-7e et let-7f ce qui expliquerait l'expression augmentée de ce gène chez les patients porteurs de la mutation (Zwiers *et al.*, 2012).

La MC est difficile à diagnostiquer, à caractériser et il peut parfois être compliqué de la distinguer de la RCH. Ainsi, des miARNs spécifiquement associés à la MC pourraient servir de biomarqueurs comme cela a été suggéré par plusieurs études (H. Jung *et al.*, 2021; Peck *et al.*, 2015; Schaefer *et al.*, 2015; Thorlacius-Ussing *et al.*, 2017).

## ii. miARNs et AIEC

Le miR-196 est surexprimé dans l'épithélium intestinal des patients atteints de MC. Ce miARN diminue l'expression de IRGM mais pas celle du variant à risque (c.313T) car le SNP est localisé dans la région de l'ARNm qui interagit avec le miARN. Cette perte de la régulation fine de l'expression de IRGM mènerait à un dysfonctionnement de l'autophagie favorisant la persistance et la multiplication de bactéries AIEC (**Figure 51**) (Brest *et al.*, 2011). Il a été démontré *in vitro* que les miARNs miR-106b et miR-93 diminuaient l'expression de ATG16L1 inhibant l'autophagie et bloquant l'élimination des AIEC (C. Lu *et al.*, 2014). Une autre étude a montré qu'*in vitro*, l'infection par les AIEC induisait la surexpression des miR-30c et miR-130a *via* l'activation de NF- $\kappa$ B. Ces miARNs ciblent respectivement ATG5 et ATG16L1 menant à l'inhibition de l'autophagie et à l'augmentation de la réplication intracellulaire des AIEC. Une augmentation de l'expression de ces miARNs a également été constatée chez des souris CEABAC10 infectées avec la souche AIEC LF82. Dans des cellules en culture et des entérocytes murins, l'inhibition des miARNs restaurait l'expression de ATG5 et ATG16L1 et donc l'autophagie, menant à l'élimination des AIEC (Nguyen *et al.*, 2014). Dans les 2 études présentées, une corrélation inverse entre les niveaux d'expression de ATG16L1 et miR-106b et entre ATG5/ATG16L1 et miR-30c/miR-130a était observée dans la muqueuse des patients atteints de MC, renforçant le lien entre autophagie et miARNs (C. Lu *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2014). Ainsi, il semblerait que les bactéries AIEC puissent inhiber l'autophagie *via* des modifications de l'expression des miARNs afin de favoriser leur survie intracellulaire. Une étude récente a confirmé que l'infection par les AIEC entraînait des dérégulations de l'expression des miARNs *in vitro* (Larabi *et al.*, 2020). Aussi, l'exacerbation de la colite induite avec l'infection par les AIEC chez les souris IL-10 KO observé par Guo et collaborateurs serait liée à l'expression du miARN let-7b. *In vitro*, l'infection par les AIEC entraîne une diminution de l'expression de let-7b associée à une augmentation de l'expression de TLR4. La surexpression de let-7b améliore la sévérité de la colite chez les souris IL-10 KO infectées et réduit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires *in vitro* (Z. Guo *et al.*, 2018).



**Figure 52 : Représentation schématique des études sur la méthylation de l'ADN chez les patients atteints de la MC dans différents types cellulaires.**

À gauche sont représentées les études réalisées sur des échantillons sanguins ou des cellules sanguines tandis que les études réalisées sur des tissus sont représentées à droite (adaptée de Hornschuh *et al.*, 2021).

↑: gènes hyperméthylés, ↓: gènes hypométhylés. Les gènes présentant des défauts de méthylation retrouvés dans plus d'une étude sont en gras.

PBCs : Cellules du sang périphérique, PBLs : Leucocytes du sang périphérique, PBMCs : Cellules mononucléaires du sang périphérique.



### iii. Expression des lncARNs chez les patients atteints de MC

Depuis peu, un intérêt grandissant se porte sur le rôle de lncARNs dans la pathogenèse de la MC. Les lncARNs sont des transcrits de plus de 200 nucléotides qui peuvent notamment réguler l'expression et la traduction des gènes codant pour des protéines, la stabilité des ARNm ou encore la localisation et la stabilité des protéines (Reisacher & Arbibe, 2019; Yarani *et al.*, 2018). Des modifications dans le profil d'expression de lncARNs ont été observées chez les patients atteints de MC (Yarani *et al.*, 2018). Par exemple, plus de 1200 et plus de 700 lncARNs, respectivement sur- et sous-exprimés, ont été mis en évidence dans le plasma de patients atteints de MC comparativement aux échantillons des individus contrôles (D. Chen *et al.*, 2016). Dans une autre étude, il a été observé que les niveaux d'expression des lncARNs KIF9-AS1 et LINC01272 étaient plus élevés tandis que l'expression de DIO3OS était plus faible dans les échantillons de côlon et de plasma des patients atteints de MC comparativement aux contrôles. De plus, la valeur diagnostique de ces lncARNs a été démontrée suggérant qu'ils pouvaient représenter d'éventuels biomarqueurs de la MC (S. Wang, Hou, *et al.*, 2018). Cependant d'autres études sont nécessaires pour confirmer ces résultats et caractériser le rôle fonctionnel de ces lncARNs.

### b. Méthylation de l'ADN et maladie de Crohn

Des études d'association génétique ont montré que le gène *DNMT3A*, codant pour une DNMT, portait une mutation beaucoup plus fréquemment associée aux patients atteints de MC que chez les sujets sains (Franke *et al.*, 2010). *DNMT3A* est une enzyme responsable de la méthylation de l'ADN *de novo* et joue un rôle central dans le contrôle de la réponse immunitaire. Cependant, aucune étude ne s'est intéressée aux conséquences fonctionnelles d'une telle mutation dans le gène *DNMT3A*, que ce soit au niveau de son activité ou de son implication dans la méthylation anormale de gènes dans le contexte de la MC.

### i. Études de la méthylation de l'ADN sur cellules sanguines

Les études de méthylation ADN sur des échantillons de sang provenant de patients atteints de MC avec une maladie active ou non sont diverses et incluent des analyses sur des échantillons de sang total, des cellules sanguines périphériques, les leucocytes, les PBMCs, le sérum, les lymphocytes B, T et les monocytes (**Figure 52**) (Hornschuh *et al.*, 2021). Plusieurs de ces études réalisées sur des échantillons de sang ont montré des altérations des profils de méthylation de l'ADN chez les patients atteints de MC, principalement dans des gènes impliqués dans des voies liées à l'immunité telles la réponse immunitaire ou la réponse de défense aux bactéries (Li Yim *et al.*, 2016, 2020; Z. Lin *et al.*, 2012; Moret-Tatay *et al.*, 2019; Nimmo *et al.*, 2012; Ventham *et al.*, 2016). Notamment, à partir d'échantillons de sang total, un profil de méthylation caractéristique a été mis en évidence chez les patients atteints de MC iléale comparativement à des sujets sains avec 50 sites différenciellement méthylés de manière significative, ces sites incluant des gènes impliqués dans la réponse immunitaire

(Nimmo *et al.*, 2012). Toutefois, les analyses sur cellules sanguines ont révélé des profils de méthylation cellulaires spécifiques chez les patients atteints de MC dans les différentes sous-populations de cellules sanguines, limitant la validité de ces analyses. Par exemple, une étude menée par Harris et collaborateurs n'a pas montré de profils de méthylations particuliers dans des échantillons de sang total de patients atteints de MC *vs* contrôles tandis qu'ils ont observé une hyperméthylation spécifique associée à la MC du gène *TEPP* à partir de PBMCs de patients pédiatriques nouvellement diagnostiqués (Harris *et al.*, 2012). De manière intéressante, l'hyperméthylation de *TEPP* n'a pas été retrouvée chez les patients pédiatriques sous traitement, suggérant que le statut de méthylation est associé à l'activité de la maladie (Harris *et al.*, 2012). Cela a été confirmé par les résultats des études sur les PBMCs, où l'expression de gènes identifiés comme différemment méthylés était différente entre les patients avec une MC active ou les patients en rémission (Serena *et al.*, 2020). Aussi, le gène *HDAC4* a été identifié comme hypométhylé dans les monocytes des patients atteints de MC comparativement aux contrôles, les conséquences fonctionnelles de cette hypométhylation n'ont cependant pas été étudiées à ce jour (Ventham *et al.*, 2016).

### **ii. Études de la méthylation de l'ADN sur biopsies**

Les profils de méthylation de l'ADN sont également étudiés à partir de biopsies intestinales ou à partir de cellules isolées et cultivées issues de biopsies intestinales (Hornschuh *et al.*, 2021). Des analyses sur des CEIs isolées de patients pédiatriques atteints de MC ont révélé des différences de méthylation de l'ADN au niveau de l'iléon terminal et du côlon des patients comparativement aux contrôles (Howell *et al.*, 2018). Aussi, il a été révélé un profil de méthylation particulier dans des CEIs d'enfants souffrant de MICI comparativement aux contrôles, ces altérations de la méthylation se produisant dans des sites identifiés comme subissant des changements de méthylation durant le développement gastro-intestinal (Kraiczy *et al.*, 2016). Une des complications de la MC est la sténose associée à la fibrose et il semble qu'elle soit corrélée à des profils spécifiques de méthylation. En effet, des régions différenciellement méthylées ont été observées lors de la comparaison de fibroblastes issus de muqueuses fibrotiques présentant des sténoses comparativement à des cellules issues de muqueuses non enflammées (Li Yim *et al.*, 2018; Sadler *et al.*, 2016).

### **iii. Études de la méthylation de l'ADN des cellules souches**

En plus des échantillons dérivés de l'intestin, une étude récente a étudié le statut de méthylation dans des cellules souches adipeuses humaines (hASCs) issues de patients atteints de MC. Il a été rapporté des différences de méthylation au niveau de 18 253 CpG entre les hASCs des patients atteints de MC et celles des contrôles, entraînant des changements dans l'expression des gènes différenciellement méthylés impliqués dans la réponse immunitaire, le métabolisme, la différenciation cellulaire et les processus de développement (Serena *et al.*, 2020).

#### **iv. Rôle des molécules donneuses de groupements méthyles**

Aux vues des modifications des profils de méthylation de l'ADN observés chez les patients, des études se sont intéressées aux molécules donneuses de groupements méthyles. Il a été démontré que des déficiences en vitamine B12 et en folate sont fréquemment rapportées chez les patients atteints de MC (Bermejo *et al.*, 2013; S. Huang *et al.*, 2017; Madanchi *et al.*, 2018; Yakut *et al.*, 2010). Des régimes alimentaires enrichis ou déficients en groupements de donneurs méthyles ont été testés dans différentes études. Il a été montré que chez des souris CEABAC10 nourries avec un régime appauvri en donneurs de groupements méthyles, le promoteur du gène *CEACAM6* était hypométhylé ce qui menait à une expression anormale de *CEACAM6* favorisant la colonisation intestinale par les bactéries AIEC et l'inflammation associée (Denizot *et al.*, 2015). Dans une étude de la même équipe, le promoteur du gène *CEACAM6* était hyperméthylé dans les cellules épithéliales intestinales des souris CEABAC10 nourries avec un régime enrichi en donneurs de groupements méthyles, menant à une diminution de l'expression de *CEACAM6* et à une limitation de la colonisation intestinale par les bactéries AIEC (Gimier *et al.*, 2020). Ainsi, ces résultats suggèrent qu'une supplémentation en donneurs de groupements méthyles pourraient être envisagée pour réguler le niveau de méthylation dans les cellules et ainsi contrôler l'expression de gènes clés influant sur la susceptibilité à être colonisé par les AIEC.

L'ensemble de ces travaux suggère fortement que des défauts de méthylation de l'ADN pourraient être impliqués dans la physiopathologie de la MC. Toutefois, d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre comment ces profils de méthylation spécifiques contribuent à la physiopathologie de la MC.

#### **c. Modifications des marques histones, HDACs et maladie de Crohn**

##### **i. Modifications post-traductionnelles des histones dans la MC**

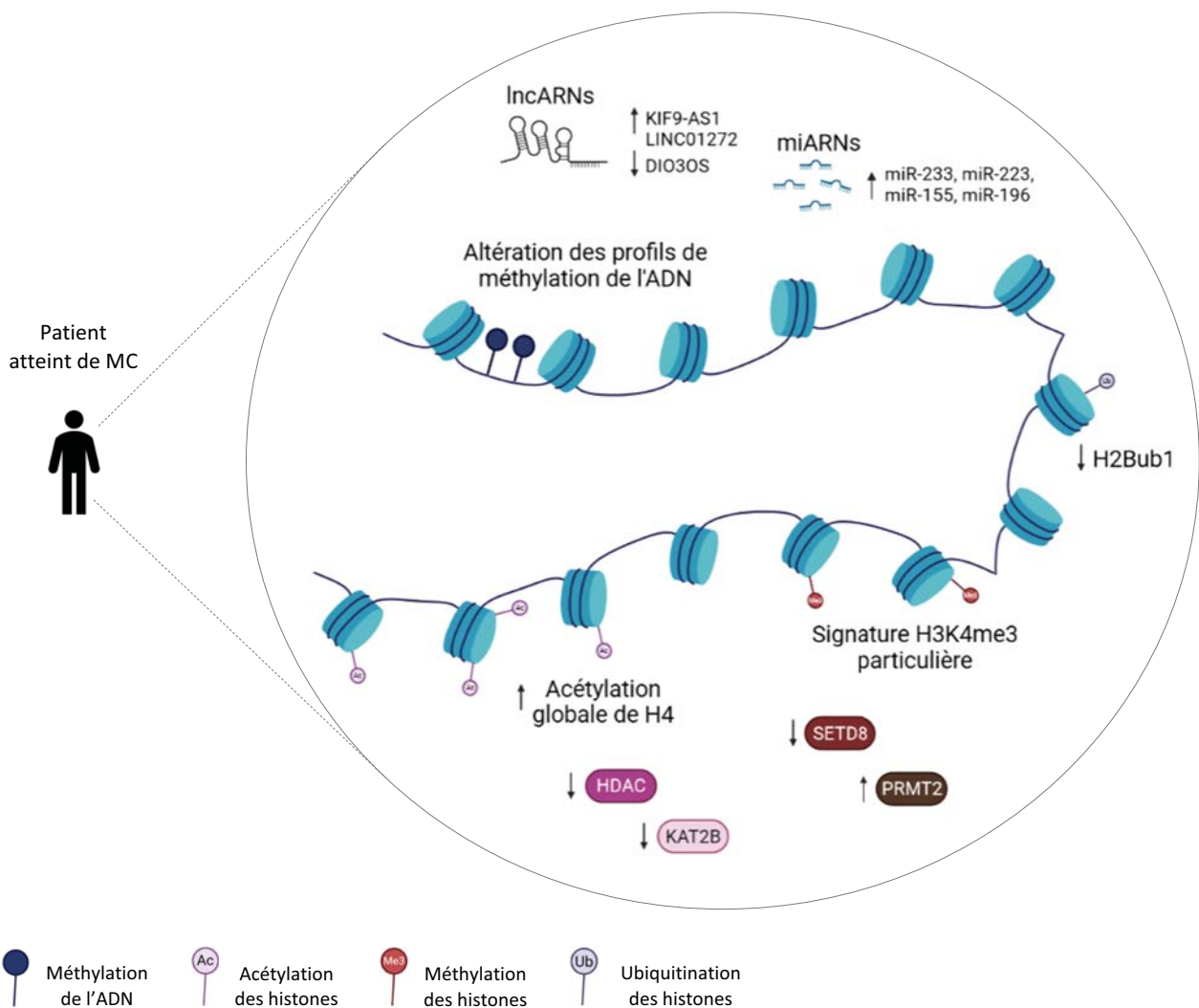
Les modifications post-traductionnelles des histones dans le contexte de la MC ont été relativement moins étudiées que la méthylation de l'ADN. Il a été mis en évidence une signature particulière H3K4me3 dans des cellules épithéliales intestinales isolées de l'iléon terminal de patients nouvellement diagnostiqués, les gènes présentant un enrichissement en cette marque permissive ayant été identifiés comme impliqués dans la réponse immunitaire de la cellule face à des facteurs bactériens (D. Kelly *et al.*, 2018). Aussi, parmi une partie des gènes présentant des altérations de H3K4me3, il existait une corrélation entre les niveaux de H3K4me3 et la sévérité de l'inflammation intestinale malgré l'absence d'une expression significativement différente de ces gènes entre les patients atteints de MC et les contrôles (D. Kelly *et al.*, 2018). Un niveau d'acétylation global de l'histone H4 plus élevé a été observé dans des biopsies enflammées et dans des plaques de Peyer issues de patients atteints de MC comparativement à des tissus contrôles d'individus sains et des tissus non enflammés issus de patients, suggérant une association entre acétylation des histones et inflammation intestinale dans la MC (Tsaprouni *et al.*, 2011). Cette étude a également montré dans 2 modèles de colite *in vivo* que l'histone

H4 était significativement plus acétylée dans les tissus enflammés des animaux présentant une colite comparativement aux animaux contrôles (Tsaprouni *et al.*, 2011). Une autre étude a montré une augmentation de H3K27ac au niveau de promoteurs et « enhancers » spécifiques dans le côlon de souris sous DSS comparativement aux souris contrôles, ce qui renforce le lien entre acétylation des histones et inflammation intestinale (M. Chen *et al.*, 2019). Ils ont également identifié 56 gènes comme étant différentiellement exprimés et associés à l'augmentation de H3K27ac au niveau des « enhancers » dans le côlon des souris suite à un traitement au DSS. Toutefois, Felice et collaborateurs ont observé une diminution de l'acétylation de H3K27 dans le côlon de souris présentant une colite induite au DSS, l'acétylation augmentant après l'arrêt du DSS (Felice *et al.*, 2020). Dans une autre étude, il a été observé une perte de la mono-ubiquitination de H2B (H2Bub1) dans les tissus enflammés de patients atteints de MICI, ce qui favoriserait l'inflammation intestinale. En effet, dans un modèle murin n'exprimant plus les ubiquitines ligases *Rnf20* ou *Rnf40* dans les CEIs, les animaux présentaient une perte de H2Bub1 et développaient une inflammation colorectale spontanée (Kosinsky *et al.*, 2021).

## ii. Acteurs épigénétiques dans la MC

Une diminution globale de l'expression de 8 HDACs classiques (sur 11) a été observée dans des CEIs isolées de biopsies coliques de patients en situation de poussées inflammatoires comparativement à des sujets sains (Friedrich *et al.*, 2019). Une diminution de l'expression de HDAC3 au niveau de l'iléon terminal de patients atteints de MC a aussi été rapportée dans une autre étude (Alenghat *et al.*, 2013). Ces variations d'expression pourraient expliquer les modifications d'acétylation observées au niveau intestinal chez les patients. L'expression de SETD8, une histone méthyltransférase, était diminuée dans la muqueuse colique des patients atteints de MC comparativement aux contrôles. SETD8 est un régulateur important de l'inflammation, l'inhibition de SETD8 aggravant la colite chez des souris sous DSS (P. Chen *et al.*, 2021). Aussi, il a été révélé que la lysine acétyltransférase 2B (KAT2B) était significativement moins exprimée dans les tissus enflammés de patients atteints de MC comparativement aux individus contrôles sains tout comme l'IL-10 (Bai *et al.*, 2016). *In vitro*, l'inhibition de KAT2B réduisait le niveau d'acétylation de H4K5 au niveau du promoteur de l'*IL-10*, suggérant que la diminution de l'expression de KAT2B chez les patients atteints de MC participerait à la pathogenèse de la MC en réprimant l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. De plus, la protéine arginine méthyltransférase 2 (PRMT2) est fortement exprimée chez les patients atteints de MC. La surexpression de *PRMT2* aggrave la colite induite au DSS chez les animaux en augmentant la méthylation de H3R8me2a, ce qui conduit à la répression de SOCS3 et l'activation de la voie NF-κB (J. Li *et al.*, 2022).

De plus, d'autres acteurs épigénétiques sont liés à la MC. C'est notamment le cas de la protéine « reader » SP140 (« Speckled Protein 140 »), qui contient des domaine PHD et un bromodomaine, dont le polymorphisme est associé à la MC, les patients porteurs du SNP présentant des niveaux réduits de la



**Figure 53 : Altérations épigénétiques observées chez les patients atteints de MC.**

Les principales altérations épigénétiques détectées chez les patients atteints de MC, telles que des variations de profils de méthylation de l'ADN, des modifications des marques histones et de l'expression des protéines « readers » et « erasers » ou encore les modulations de l'expression des miARNs et des lncARNs, sont présentées sur la figure.

HDAC : Histone désacétylase, KAT2B : Lysine acétyltransférase 2B, lncARNs : ARNs longs non codants, PRMT2 : Arginine méthyltransférase 2, SETD8 : SET domain containing (lysine methyltransferase) 8.

protéine SP140 (Jostins *et al.*, 2012; Mehta *et al.*, 2017). Il a été démontré que SP140 était nécessaire pour la réponse antibactérienne des macrophages et que cette protéine limitait l'expansion des Protéobactéries chez les souris et l'Homme (Fraschilla *et al.*, 2022). Aussi, le microbiote pro-inflammatoire des souris déficientes pour *Sp140* était transférable à des souris WT et exacerbait la colite induite au DSS. Une très récente étude a démontré que SP140 était un répresseur des topoisomérases qui permettait le maintien de l'hétérochromatine et de la fonction des macrophages. En effet, la perte de SP140 résultait en une activité incontrôlée des topoisomérases, en une dérégulation de gènes normalement réprimés et en une fonction altérée des macrophages qui n'étaient plus capables d'éliminer les bactéries (Amatullah *et al.*, 2022). Ainsi, SP140 est crucial pour maintenir la fonction des macrophages. Toutefois, son expression peut également être dérégulée. En effet, une étude très récente a démontré que SP140 était fortement exprimée dans les macrophages issus de la muqueuse intestinale des patients atteints de MC ainsi que dans des macrophages inflammatoires polarisés *in vitro*. L'inhibition de SP140 avec un inhibiteur permettait de réduire la différenciation des monocytes en macrophages inflammatoires et l'expression de cytokines pro-inflammatoires, démontrant qu'une fine régulation de SP140 est requise dans les macrophages pour contrôler leur fonction dans le contexte de la MC (Ghiboub *et al.*, 2022).

Ainsi, l'ensemble de ces travaux montre que les altérations épigénétiques existent chez les patients atteints de MC, que ce soit au niveau de l'expression de miARNs, de la méthylation de l'ADN ou encore au niveau des modifications post-traductionnelles des histones et de l'expression des HDACs, renforçant le fait qu'il ne faut pas négliger l'implication des facteurs épigénétiques dans la physiopathologie de la MC (**Figure 53**).





Review

# Adherent-Invasive *E. coli*: Update on the Lifestyle of a Troublemaker in Crohn's Disease

Mélissa Chervy <sup>1</sup>, Nicolas Barnich <sup>1,2</sup> and Jérémy Denizot <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, Inserm U1071, USC-INRAE 2018, Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte (M2iSH), 63001 Clermont-Ferrand, France; melissa.chervy@uca.fr (M.C.); nicolas.barnich@uca.fr (N.B.)

<sup>2</sup> Institut Universitaire de Technologie, Génie Biologique, 63172 Aubière, France

\* Correspondence: jeremy.denizot@uca.fr; Tel.: +33-04-73-17-83-81

Received: 8 May 2020; Accepted: 24 May 2020; Published: 25 May 2020



**Abstract:** Besides genetic polymorphisms and environmental factors, the intestinal microbiota is an important factor in the etiology of Crohn's disease (CD). Among microbiota alterations, a particular pathotype of *Escherichia coli* involved in the pathogenesis of CD abnormally colonizes the intestinal mucosa of patients: the adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) pathobiont bacteria, which have the abilities to adhere to and to invade intestinal epithelial cells (IECs), as well as to survive and replicate within macrophages. AIEC have been the subject of many studies in recent years to unveil some genes linked to AIEC virulence and to understand the impact of AIEC infection on the gut and consequently their involvement in CD. In this review, we describe the lifestyle of AIEC bacteria within the intestine, from the interaction with intestinal epithelial and immune cells with an emphasis on environmental and genetic factors favoring their implantation, to their lifestyle in the intestinal lumen. Finally, we discuss AIEC-targeting strategies such as the use of FimH antagonists, bacteriophages, or antibiotics, which could constitute therapeutic options to prevent and limit AIEC colonization in CD patients.

**Keywords:** Crohn's disease; adherent-invasive *Escherichia coli*; AIEC-host interaction; virulence gene; intestinal environment; AIEC-targeting therapy; microbiota

## 1. Introduction

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are inflammatory bowel disease (IBD) characterized by chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal (GI) tract. CD, first described in 1932 by the doctor Burill B. Crohn [1], is an inflammatory disease of the intestinal mucosa developing preferentially in the young adult and evolving in a relapsing and remitting manner. It can affect all the segments of the GI tract with preferential localization in the terminal ileum and the colon. To date, no curative treatment exists for CD patients, only symptomatic treatments are proposed to limit the frequency and the intensity of the inflammatory flare [2].

The etiology of CD is multifactorial, resulting from the interplay between genetic susceptibility, environmental factors, and abnormal intestinal microbiota composition. Several genetic polymorphisms increase the risk of developing CD. As examples, three polymorphisms in the gene *NOD2*, involved in the intracellular recognition of bacterial muramyl dipeptide (MDP), have been highly associated to a higher risk to develop CD in many cohorts of patients [3,4]. Genes involved in the autophagy pathway, important for the elimination of intracellular bacteria, such as *ATG16L1* and *IRGM*, have also been found mutated in CD patients [5–7]. CD is, however, not a genetic disease as many studies observed discordances in monozygotic twins [8–10], indicating the involvement of other factors in its etiology. Talking in regards with the environmental factors, smoking has been identified as a

risk factor for the development of CD, and consumption of Western diet (low-fiber diet enriched in total fat and sugar) and dietary emulsifiers (present in processed foods) are together associated with a higher susceptibility to develop CD [11–14]. The role of microbial composition of the intestinal microbiota has also been largely studied for its implication in the etiology of CD. Dysbiosis has been observed in CD patients characterized by a reduction of the global microbial diversity and, more specifically, a decrease in beneficial bacteria such as those of the *Firmicutes* phylum and an increase of the *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* phyla [15–20]. Enterobacteria, members of the *Proteobacteria* phylum, can represent up to 100% of the anaerobic microbiota associated to the ileal mucosa in CD, and particular adherent strains of *Escherichia coli* have been identified in the inflamed ileal and colonic mucosa of CD patients [21–27]. Both abilities of these strains to adhere to and to invade intestinal epithelial cells (IECs) as to survive and to replicate within macrophages led to the definition of a new pathogenic group: the adherent-invasive *E. coli* (AIEC) [21,22,28]. Preclinical models of CD suggest an important role of these bacteria in the induction and/or maintenance of intestinal inflammation in CD patients [29–31]. In this review, we describe the lifestyle of AIEC bacteria within the intestine, from the interaction with intestinal epithelial and immune cells with an emphasis on environmental and genetic factors favoring their implantation, to their lifestyle in the intestinal lumen. Based on the recent literature, this review will also discuss the new therapeutic strategies which could be developed to limit AIEC overgrowth in CD patients and ongoing clinical trials targeting AIEC bacteria.

## 2. The Challenging Identification of AIEC Bacteria in CD Patients

The prevalence of AIEC bacteria in the mucosa ranges from 21% to 62% in CD patients versus 0% to 19% in healthy controls, AIEC being found more frequently associated to the ileum than to the colon [22,24,32]. AIEC bacteria are also detected in healthy controls, at a lower rate than in CD patients, without inducing CD-specific symptoms. These bacteria occur not to be strict pathogens, as defined by the Koch's postulate, but to be pathobiont bacteria which take advantage of host genetic alterations and/or take advantage of a specific environment to favor their implantation in ileal mucosa to induce intestinal inflammation in CD patients.

Despite some metabolic abilities (use of propanediol and iron uptake), different transcriptomic profiles of AIEC vs. commensal *E. coli*, and enrichment in specific polymorphisms in virulence genes, no specific gene for all AIEC strains has been detected, nor molecular markers common to all AIEC, making it difficult to identify AIEC-positive patients [33]. A study involving CD patients called "MOlecular Biomarkers and Adherent and Invasive *Escherichia coli* (AIEC) Detection Study in Crohn's Disease Patients" (MOBIDIC) was performed to evaluate the relationship between noninvasive biomarkers and AIEC detection in intestinal biopsies. The objective was to develop a predictive algorithm of AIEC carriage, but the results of this trial have yet to be released (NCT02882841). In a recent study, Camprubí-Font et al. identified three AIEC-associated single nucleotide polymorphisms (SNP), and they elaborated from these SNP an algorithm able to predict AIEC phenotype with high accuracy (84%), showing that these SNP could be used to predict the carriage of AIEC [34]. However, it has recently been demonstrated that this prediction of AIEC phenotype was not reproducible with *E. coli* strains from different cohorts meaning that it is not a robust method to identify AIEC [35]. Hence, to date, the only way to identify AIEC strains is to evaluate the ability of mucosa-associated *E. coli* to invade IECs and to survive within macrophages in vitro.

Many research groups now focus their work to better understand how AIEC bacteria evolved from commensal *E. coli* strain, how AIEC bacteria interact with the complex microenvironment of the digestive tract, how they take advantage of specific environmental conditions, how they interact with IECs, and how they subvert host defense to colonize intestinal mucosa of CD patients. The common efforts should lead to get a better grasp of the physiology of these bacteria to propose new diagnostic approaches to identify CD patients colonized by AIEC bacteria easily and should lead to the development of new therapeutic approaches to eliminate AIEC bacteria.

### 3. Access to the Mucosa

#### 3.1. Mucus Crossing

A protective mucus layer covers the surface of the intestinal epithelium and is composed of gel-forming glycoproteins called mucins, secreted by specialized goblet cells [36]. The mucus layer is central in the protection against many intestinal pathogens, such as *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella enterica* [37,38]. Carbohydrate structures on mucins are targeted by pathogenic bacteria for their attachment to intestinal mucosa, avoiding their elimination through the natural transit [39]. In CD patients, the mucus layer is essentially continuous and comparable to healthy mucosa, although abnormal expression and glycosylation of the mucins have been noticed, which renders the mucus layer more penetrable by commensal and pathogenic bacteria [40–44]. Interestingly, a study using IECs lines revealed that AIEC strain LF82 (one of the AIEC reference strains isolated from CD patients) infection decreased the expression of MUC2 and MUC5A [45]. Pathogenic bacteria, such as Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC), Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), or *Shigella flexneri* possess mucinase activity allowing the degradation of mucins to facilitate their passage through the protective layer. A study by Gibold et al. revealed that AIEC bacteria strain LF82 exhibited a mucinolytic activity mediated by the bile salt- and mucin-mediated upregulation of *vat-AIEC* gene expression. The expression of this protease by AIEC bacteria conferred a better ability to colonize the digestive tract of genetically susceptible CEABAC10 mice overexpressing human CEACAMs molecules, mimicking CD susceptibility [29,46]. Their study also described the role of Vat-AIEC mucinase in the spread of AIEC in the mucus, by decreasing the viscosity of the mucus, and, as a consequence, in the access to epithelial cells (Figure 1). These data show that the mucinase Vat-AIEC contributes to the virulence of AIEC at the first step of infection as it favors the penetration of AIEC through the mucus layer and their adhesion to IECs.

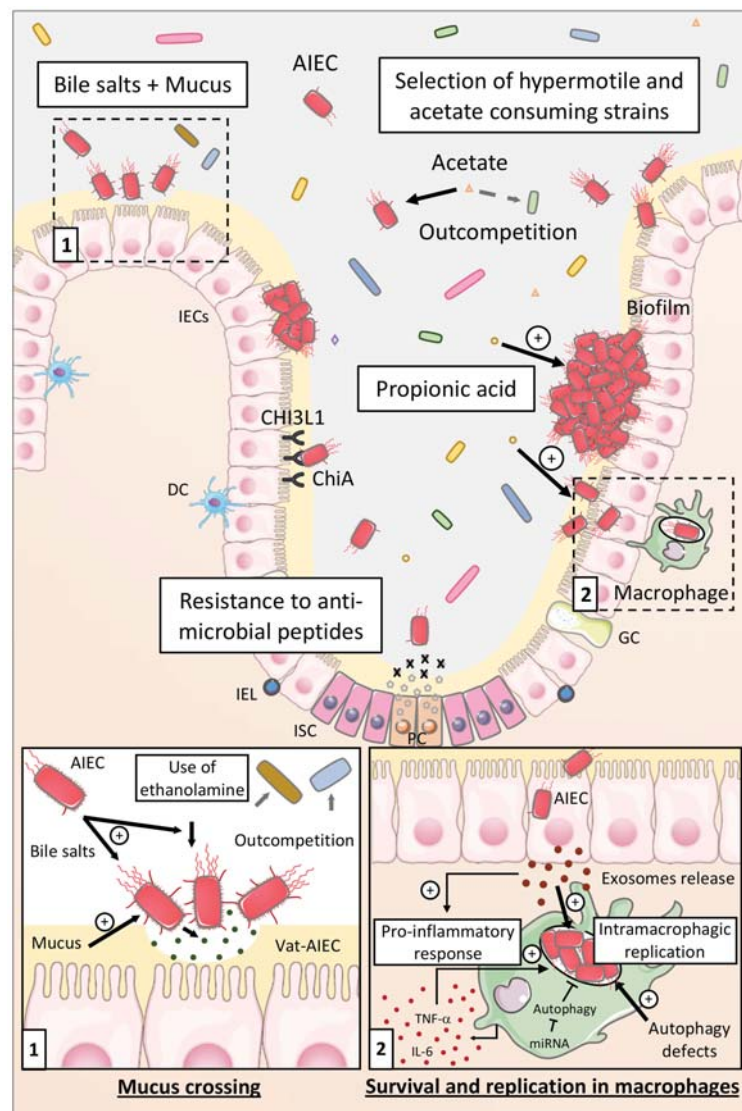
#### 3.2. Flagellum Regulation

AIEC bacteria flagella, which are filamentous organelles that allow locomotion, bacterial mobility, encoded by the *fliC* gene coding for FliC protein being the major component of flagellum, plays a central role in the adhesion process of the bacteria to IECs directly, *via* motility and indirectly, by maintaining the expression of type 1 pili [47,48]. Moreover, flagellum expression is directly involved in the induction of intestinal inflammatory response, through its binding to Toll-like receptor 5 (TLR5), an activator of the innate immunity (see below).

A recent study noteworthy identified the hypermotile phenotype as selected during evolution of AIEC under gastrointestinal conditions. The passage of an ancestor AIEC strain in the digestive tract of mice and the natural transmission between mice led to the selection of AIEC strains with a hypermotile phenotype and an increased fitness *in vivo* (Figure 1). Genome sequencing revealed that the hypermotility of selected strains was due to the integration of a mobile insertion sequence upstream of the master flagellar regulator, *flhDC*, which enhanced AIEC invasion and promoted the establishment of a mucosal niche [49].

Importantly, flagellin is also expressed by commensal bacteria without inducing uncontrolled inflammation suggesting specific regulation of flagellin expression in AIEC bacteria during the colonization process. A recent paper from Sevrin et al. uncovered an interesting regulation mechanism of *fliC* gene expression in AIEC bacteria. A different regulation of *fliC* gene expression was noticed in response to intestinal microenvironment components between AIEC bacteria and commensal *E. coli* HS strain. Indeed, a gene reporter system was used to reveal that *fliC* gene was upregulated in response to bile salts and mucus in AIEC bacteria but not in commensal strains. Thus, these specific features would then confer a selective advantage to AIEC pathobiont for the colonization of ileal mucosa of CD patients. To highlight the effect of *fliC* gene expression during intestinal colonization, the authors created an AIEC strain constitutively overexpressing *fliC*, through the deletion of the negative regulator *flgM* gene, and observed that this strain induced uncontrolled inflammatory response in the mice

leading to its rapid clearance from the intestine, unlike the wild-type strain. From these facts, we would conclude that AIEC bacteria are able to regulate finely flagellum production to avoid overactivation of the immune system, allowing their long-term persistence in the gut [50].



**Figure 1.** Access to the mucosa and impact of luminal molecules on adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) virulence and colonization. In the lumen, bile salts and mucus favor the expression of several AIEC virulence genes such as *lfp*, *fliC*, and *vat*-AIEC promoting mucus crossing. Bile salts also induce ethanolamine metabolism in AIEC conferring a competitive advantage over commensal bacteria (1). AIEC strains presenting hypermotile phenotype and able to use acetate are selected under gastrointestinal conditions, while the short-chain fatty acids (SCFA), propionic acid, exacerbates AIEC phenotype with increased abilities to form biofilms, to adhere to and invade intestinal epithelial cells (IECs). Conditions promoting AIEC survival and replication within macrophages (2) as well as ChiA-CHI3L1 interaction and AIEC resistance to antimicrobial peptides are also represented. DC, dendritic cell; GC, goblet cell; IECs, intestinal epithelial cells; IEL, intraepithelial lymphocytes; IL-6, interleukin 6; ISC, intestinal stem cell; PC, Paneth cell; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha.

### 3.3. Resistance to Antimicrobial Peptides

Paneth cells, found in the crypt of the small intestine, secrete antimicrobial peptides (defensins) such as  $\alpha$ - and  $\beta$ -defensins, cathelicidins, RegIII family antimicrobial lectins, and lysozyme which diffuse, following a concentration gradient, within the mucus layer [51]. These defensins are involved



in the maintenance of host–microorganisms homeostasis through the killing of bacteria [52]. In this context, AIEC bacteria must either take advantage of deficiencies in defensins secretion in CD patients or develop resistance to antimicrobial peptides (Figure 1). A paper from McPhee et al. identified 2 genes involved in the antibacterial peptides resistance in AIEC strain NRG857c isolated from a CD patient. They observed that the plasmid carried by this specific AIEC strain (pO83) comprises genomic island containing two genes involved in resistance to cationic antimicrobial peptides: *arlA* and *arlC*. *arlA* encodes a Mig-14 family protein implicated in defensin resistance, whereas *arlC* encodes an OmpT family outer membrane protease. The authors nicely confirmed the role of these genes in the resistance of AIEC strain NRG857c and other strains from CD patients to antimicrobial peptide using in vitro and in vivo approaches [53].

Thus, through diverse virulence factors, AIEC bacteria are able to cross the mucus layer and to regulate finely their flagella expression to reach the intestinal epithelium where they will use different strategies to favor their encroachment to the intestinal mucosa.

#### 4. Interaction with the Intestinal Epithelium: Adhesion to IECs

##### 4.1. Type 1 pili-CEACAM6 Interaction

Once in contact with IECs, AIEC bacteria use different strategies to interact with the cell and to invade it. One of the best-characterized interactions is the Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6)-FimH interaction. FimH is an adhesin located at the tip of type 1 pili highly expressed by AIEC bacteria and coregulated with flagella expression. Type 1 pili mediate bacterial adhesion to IECs and also play an important role in the ability of AIEC to invade IECs [54]. Some recently acquired mutations in *fimH* gene have been identified as conferring AIEC bacteria a significantly higher ability to adhere to IECs, strains harboring these mutations mostly belong to the B2 phylogroup, which regroups the most pathogenic *E. coli* strains. These data show that the important ability of AIEC to adhere to IECs could be the consequence of pathoadaptive mutations acquired during evolution and selected by gastrointestinal environment [55]. A work from Barnich et al. identified the highly mannosylated glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein CEACAM6 as a receptor for AIEC bacteria. Indeed, the authors observed that mannose addition to the medium or *fimH* mutation in AIEC bacteria inhibited the adhesion of AIEC bacteria to human enterocytes from CD patients. Moreover, antibodies directed against CEACAM6 protein also prevented the interaction [56]. A more recent study better characterized CEACAM6-FimH interaction. Dumych et al. showed that oligomannose glycans exposed on early apoptotic cells are the binding targets of AIEC, which would mean that apoptotic cells could serve as potential entry points for bacteria into the epithelial cell layer before propagating literally in the intercellular spaces. The authors also identified two oligomannosidic glycans (Asn-197 and Asn-224) in CEACAM6 protein which could be potential receptors for the FimH adhesin [57].

These data obviously showed that AIEC bacteria bind to the CEACAM6 molecule and that this interaction depends on FimH adhesin expression and mannose residues on CEACAM6. Interestingly, in physiological conditions, CEACAM6 is not expressed by ileal epithelial cells but this protein has been found expressed at an important level in ileal mucosa of CD patients [56,58]. In vitro, AIEC bacterial infection of IECs led to the induction of CEACAM6 gene expression, due to hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) stabilization, implying that these bacteria can favor their own colonization in CD patients by activating signaling pathways in the host cell [59,60].

##### 4.2. ChiA-Chitinase 3-Like-1 Interaction

AIEC can also adhere to IECs through other host factors such as the Chitinase 3-like-1 (CHI3L1). CHI3L1, belonging to the glycohydrolase 18 family of chitinases, contains chitin-binding domain (CBD) and was reported to be upregulated during intestinal inflammation, predominately on IECs and lamina propria (LP) macrophages [61,62]. Interestingly, an acute colitis can be exacerbated *via*

CHI3L1 overexpression favoring bacterial adhesion and internalization into IECs [61]. The bacterial *chiA* gene was identified in AIEC bacteria as involved in the interaction with IECs, and five conserved polymorphisms within the *chiA* gene were identified in pathogenic *E. coli* strains compared to nonpathogenic *E. coli* strains notifying that these polymorphisms may have been selected and could be associated to the virulence of AIEC bacteria. The interaction is mediated by the CBD of the AIEC chitinase ChiA that recognizes CHI3L1, and, more specifically, the *N*-glycosylation of asparagine 68 residue in mouse CHI3L1, this specific interaction promoting pathogenic effects of AIEC in mice with colitis [63].

#### 4.3. AIEC-M-cells Interaction

Host-AIEC interaction can also occur through the follicle-associated epithelium (FAE) overlying Peyer's Patches (PP), where M-cells are located, *via* Long Polar Fimbriae (LPF) expression by the bacteria. Indeed, a *lpf*-negative AIEC mutant was highly impaired in its ability to interact with mouse and human PP and to translocate across monolayers of M-cells (specialized cells of FAE), demonstrating that LPF, whose expression is dependent of bile salts concentration is a key factor for AIEC-PP interaction [64–66]. AIEC could also bind M-cells *via* the interaction between the FimH adhesin and the glycoprotein 2 (GP2), expressed on the apical membrane of M-cells promoting mucosal immune response to AIEC [67]. Deficiency of host GP2 altered transcytosis of type 1-piliated bacteria through M-cells and reduced the immune response in PP demonstrating that GP2 serves as a transcytotic receptor. In addition, colonic M cells express the highly glycosylated CEA and CEACAM1 molecules at their apical surface which could potentially play the role of receptors through a FimH-CEACAM interaction [68].

#### 4.4. Invasion of IECs by AIEC Bacteria

Outer membrane vesicles (OMV), whose production is dependent on the *yfgI* gene, are involved in the invasive ability of AIEC LF82, by delivering bacterial effectors to host cells [69]. The major protein on the surface of OMV, OmpA, binds to the ER-localized stress response protein Gp96. Gp96 is overexpressed on the apical surface of ileal IECs in CD patients, and the OmpA-Gp96 interaction favors the fusion of OMV with IECs and promotes AIEC invasion through the delivery of proteins and different molecules within the host cell [70,71].

The pathogenic role of *ibeA* gene has been reported in many pathogenic bacteria. Of note, different strains of AIEC bacteria carry this gene (NRG857c, LF82, UM146, and KD-1) suggesting a potential role of this gene in the virulence of AIEC bacteria. A study revealed the role of *ibeA* gene in the interaction of AIEC with IECs. In vitro, an *ibeA*-deleted mutant AIEC strain was impaired in its ability to invade IECs, M-like cells, and to survive within macrophages, but was not impaired in its adhesion ability, supporting the fact that IbeA protein is involved in the AIEC invasion process. Finally, in vivo experiments revealed that *ibeA* was involved in the inflammatory response induced during intestinal colonization of AIEC [72].

In order to prevent AIEC entry in host cells, it seems necessary to identify new bacterial invasins and human proteins needed for the invasion process of IECs by AIEC. The genes coding for invasins could be identified using a transposon mutagenesis coupled with next-generation sequencing (Tn-seq) approach, which is based on the generation of a transposon insertion library and the identification of mutants unable to invade host cells. The lost mutants might harbor the transposon in either an essential gene for bacterial growth or in genes necessary for AIEC adhesion and/or invasion. Transposon-disrupted genes can be identified through next-generation sequencing of the flanking regions of the transposon insertion in recovered bacteria [73]. This strategy could be relevant to determine new virulence factors in AIEC bacteria not only for interaction with host cells but also for its fitness in vivo.



## 5. Consequences of AIEC Interaction with Epithelial Layer

### 5.1. Effects of AIEC on Epithelial Barrier Function

The epithelial cells from the intestine are interconnected by tight junctions (TJ) and adherent junction proteins, forming the apical junctional complex (AJC) to create a selectively permeable barrier necessary to protect the host against pathogenic bacteria and their toxins [74,75]. Deficient barrier function is frequently observed in CD patients and is predictive of relapses in CD [76]. The effect of AIEC infection on barrier function has been studied in different models. Several studies demonstrated in vitro that infection with AIEC decreased transepithelial resistance of an IECs monolayer and induced the delocalization of the tight junction adaptor protein ZO-1 and E-cadherin and the disorganization of F-actin. AIEC might then be involved in the defective barrier function observed in CD patients [77,78]. AIEC infection of CEABAC10 mice led to an increase in intestinal permeability, in a type-1 pili-dependent manner, and to the induction of pore-forming claudin-2 expression in IECs. Co-overexpression of claudin-2 and CEACAM6 was reported in quiescent and active phases CD patients, although the presence of AIEC bacteria associated to the mucosa has not been defined in this study [79].

Many factors have been suggested as favoring the ability of AIEC to colonize the intestinal epithelium and altering barrier function. Remarkably, the overexpression of CEACAMs genes in the mouse model of CD (CEABAC10 mouse model) was associated to an abnormally increased intestinal permeability, without signs of inflammation in the colonic mucosa, pointing that abnormal expression of CEACAMs genes, as notified in ileal mucosa of CD patients, could alter the integrity of the epithelial layer by itself. Importantly, the CEABAC10 mice are highly sensitive to dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis, confirming a barrier defect at a steady state upon CEACAMs overexpression [79]. High-fat diet and vitamin D deficiency have also been associated to altered barrier function. Of note, high-fat/high-sugar (HF/HS) diet favors AIEC colonization and vitamin D deficiency predisposes to AIEC-induced barrier dysfunction [80,81].

All these experimental data prove that AIEC bacteria can increase intestinal permeability in CD patients but also take advantage of already altered intestinal barrier by environmental factors or genetic susceptibility.

### 5.2. Effects of AIEC on Host Glycosylation

Glycobiology, which consists in the study of functional roles of sugar in the cell, has emerged as potentially interesting to bring to the notice of the etiology of CD and to identify new therapeutic targets [82]. In a recent study, Sun et al. showed that level of O-Linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is increased in intestinal tissue of CD patients when compared to healthy controls [83]. Intestinal epithelial cells from mice and human cell lines infected with the AIEC reference strain LF82 presented a striking increase in the level of UDP-GlcNAc, a donor glucosamine for glycosylation, which was associated to an increase in O-GlcNAc. As a consequence, O-GlcNAc on NF- $\kappa$ B facilitated its nuclear translocation and the transactivation of NF- $\kappa$ B targeted inflammatory genes and limited autophagy-mediated elimination of intracellular AIEC bacteria. The authors managed to reverse the effect by using an inhibitor leading to depletion of O-GlcNAc in IECs and observed an overactivation of autophagy and anti-inflammatory effect in mice treated with the inhibitor, infected with AIEC bacteria, and treated with DSS.

This study is preliminary in the field of glycobiology and AIEC bacteria as many other cellular pathways might be modulated by AIEC bacteria in a glycosylation-dependent manner, opening new research avenues for therapeutic targets for CD patients.

### 5.3. Induction of Fibrosis by AIEC

Tissue fibrosis is often detected in CD patients due to chronic inflammation and it leads to extensive local intestinal fibrosis and mechanical bowel obstruction that may require surgical resection and endoscopic dilation [84]. Small et al. demonstrated that chronic AIEC infection triggered intestinal

inflammation and fibrosis, the factors leading to the establishment of fibrosis remaining unknown [85]. In a mouse model of IBD, the IL-10 KO mice model developing spontaneous colitis, germ-free mice infected with yersiniabactin-producing AIEC developed fibrosis. Infection with a  $\Delta fyuA$  mutant, unable to import the Ybt siderophore, resulted in increased expression of profibrogenic genes, enhanced subepithelial invasion, and exacerbated fibrosis compared to infection with wild-type (WT) strain. In contrast, mice infected with the isogenic mutant  $\Delta irp1$ , unable to synthesize Ybt, as well as with the  $\Delta fyuA\Delta irp1$  mutant presented reduced fibrosis incidence demonstrating that fibrosis development depends on the biosynthesis of Ybt, which creates a profibrotic environment when not associated with its receptor [86]. In a mouse model of AIEC infection followed by acute inflammatory trigger (DSS or *Salmonella* infection), AIEC bacteria stably colonized the inflamed gut, leading to massive deposits of collagen and consequently fibrosis, which was not observed in nonpathogenic *E. coli*-infected mice [87]. This work revealed that AIEC induce fibrosis through the activation of the IL-33-ST2 signaling, through the flagellin-induced expression of IL-33 receptor ST2. The binding of IL-33 to its receptor ST2 leads to the activation of NF- $\kappa$ B and MAPK pathways and to the production of pro-inflammatory cytokines that promote TGF- $\beta$  and collagen deposition in the extracellular matrix [88,89]. These results show that AIEC can induce fibrosis upon chronic intestinal colonization and inflammation, *via* flagellin or the biosynthesis of siderophore.

#### 5.4. Induction of Inflammation during AIEC Colonization

##### 5.4.1. Through the TLR Pathway

Once the AIEC–host interaction is established, host response sets up like induction of an inflammatory response characteristic of CD. Flagellum expression is directly involved in intestinal inflammatory response. Indeed, flagellin is a microbe-associated molecular pattern (MAMP) recognized by innate immune system receptors: the transmembrane TLR5 and the cytoplasmic receptor NLR family CARD domain-containing protein 4 (NLRC4) [30,90,91]. The pro-inflammatory role of flagellin has been confirmed in a mouse model of infection with AIEC bacteria where Carvalho et al. observed that AIEC strain LF82 infection increased expression of TLR5 and NLRC4 and aggravated DSS-induced colitis in mice characterized by severe histopathological damage and increased expression of *IL-1 $\beta$*  and *IL-6* in a flagellin expression-dependent manner [92].

Lipopolysaccharide (LPS) is also a MAMP that can activate TLR4 receptor and elicits intestinal inflammation. However, under healthy conditions, IECs down-regulate TLR4 expression to limit its activation and uncontrolled inflammatory response [93]. MicroRNAs (miRNAs), small noncoding RNA that post-transcriptionally regulate genes expression, are involved in various processes such as cellular proliferation/differentiation and immune response to pathogens. Misregulation of miRNAs has been associated with several disorders including IBD [94,95]. Guo et al. demonstrated in IL-10 KO mice that AIEC LF82 infection exacerbated colitis and, unlike non-infected mice, AIEC-infected mice presented decreased miRNA let7b, increased TLR4 expression, and increased secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )) in colonic epithelial cells. In vitro, in T84 cells, overexpression of TLR4 and consequently the release of pro-inflammatory cytokines was due to the reduced expression of let-7b caused by AIEC infection [96]. These effects were reversed in vivo and in vitro with the overexpression of let-7b. Furthermore, inhibition of let-7b led to increased pro-inflammatory cytokines release in nonpathogenic *E. coli* K-12-infected cells suggesting that through the inhibition of let-7b, AIEC induce the overexpression of TLR4 that triggers an excessive inflammatory response to AIEC and to nonpathogenic bacteria.

##### 5.4.2. Through Survival and Replication within Macrophages

Macrophages are key cells of the innate immune system, they can recognize MAMP (LPS, flagella, and peptidoglycan) through pattern recognition receptors (PRR) such as TLRs. The interaction between TLR and MAMP activates the NF- $\kappa$ B, MAPK, and IRF pathways leading to the expression of genes coding

for pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  or IL-6. Macrophages also limit bacterial dissemination through phagocytosis and through presentation of antigens to activate adaptive immune cells [97]. Macrophages are found in greater numbers in inflamed tissue in CD patients [98], and as mentioned above, AIEC bacteria are able to survive and to replicate within J774 macrophages, in phagolysosomes, without inducing cell death [99] through the induction of the stress gene *htrA*, the oxidoreductase *dsbA* gene, and *gipA* gene in the phagocytic vacuole. Interestingly, the induction of these genes was not observed in a nonpathogenic *E. coli* bacteria, demonstrating that the AIEC LF82 genetic background is crucial for induction of these genes transcription during phagocytosis [100–102]. Moreover, AIEC subjected to severe stresses within macrophages show heterogeneous stress responses. Indeed, AIEC LF82 either survived in phagolysosomes or underwent phenotypic switches, these responses requiring the induction of SOS responses. Phenotypic switches generated a population of nongrowing bacteria of which a portion presented antibiotic tolerance, demonstrating that intracellular stresses can create phenotypic heterogeneity within AIEC LF82 promoting the production of persister [103]. Therefore, these data demonstrate that AIEC bacteria have evolved to survive and replicate within macrophages through the acquisition of specific regulation of essential genes and essential stress responses for their survival under phagolysosomal conditions.

AIEC-infected macrophages release a large amount of TNF- $\alpha$  and do not undergo cell death [99]. In vitro, the treatment of macrophages with TNF- $\alpha$  promoted the intracellular replication of AIEC, whereas incubation of macrophages with an anti-TNF- $\alpha$  antibody impaired the intracellular replication [104]. Hence, depending on the quantity of intracellular AIEC, infected macrophages secrete different amounts of TNF- $\alpha$ , which in turn increase the intracellular replication of AIEC, demonstrating that targeting TNF- $\alpha$  could be an effective strategy to control the TNF- $\alpha$ -dependent AIEC replication within macrophages (Figure 1).

Briefly, AIEC survive and replicate within macrophages because they develop mechanisms to resist to phagolysosomal conditions and promote their own replication through the stimulation of TNF- $\alpha$  secretion by macrophages.

#### 5.4.3. Through the Release of Exosomes

Exosomes are small membrane vesicles with size ranging from 50 to 100 nm which are freed upon fusion of multivesicular bodies, containing intraluminal vesicles, with the plasma membrane. They are released from many cell types including IECs and immune cells and function in cell-to-cell communication by transferring genetic material such as noncoding RNA and proteins from a donor cell to a recipient cell [105]. Exosomes play a role in immune regulation as they participate in antigen presentation, T-cell activation, and immune suppression, and they have already been involved in infectious diseases [106,107]. Indeed, macrophages infected with intracellular pathogens such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium*, or *Toxoplasma gondii* release exosomes containing MAMP which stimulate a pro-inflammatory response when exposed to uninfected macrophages in vitro and in vivo [108]. Carrière et al. studied AIEC-infected IECs and macrophages-released exosomes and the impact of these exosomes on naive cells. In vitro, AIEC infection of human IECs (T84 cells) induced the release of a larger number of exosomes compared to uninfected cells and cells infected with a nonpathogenic *E. coli*. These exosomes from AIEC-infected cells were able to induce a pro-inflammatory response in naive T84 cells and naive THP-1 macrophages through the activation of the NF- $\kappa$ B and the MAPK pathways and the production of pro-inflammatory cytokines [109] (Figure 1). Thus, we see that upon AIEC infection, IECs let exosomes loose that can trigger, in a paracrine effect, a pro-inflammatory response in neighboring IECs but also in macrophages. A similar pro-inflammatory response was observed when naive THP-1 macrophages were exposed to exosomes freed from AIEC-LF82-infected THP-1 cells. Moreover, exosomes released from infected cells can affect AIEC LF82 intracellular replication. Naive T84 or THP-1 cells stimulated with exosomes released from uninfected IECs or macrophages presented decreased AIEC LF82 intracellular replication, whereas the intracellular replication of AIEC LF82 was increased in naive cells stimulated with exosomes

released from infected T84 or THP-1 cells. Exosomes released in the ileal lumen of AIEC LF82-infected CEABAC10 mice were able to trigger a pro-inflammatory response in naive recipient macrophages. These results suggest that AIEC are able to hijack the exosomes release to promote their own replication and to promote a pro-inflammatory response in neighboring cells.

AIEC bacteria can, in this manner, induce a pro-inflammatory response in host cells through the activation of different receptors and pathways leading to the secretion of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , promoting their intracellular replication within macrophages.

### 5.5. Control of AIEC Intracellular Replication

#### 5.5.1. Role of Autophagy in the Control of AIEC Replication

Autophagy is a process, conserved in eukaryotes, leading to the degradation of cytoplasmic materials inside lysosome. Autophagy can be induced under stress conditions like starvation to overcome nutrient deficiency by recycling some components of the cell but it can also be induced to degrade aggregated proteins, damaged mitochondria, or invading pathogens in nonstarved cells. Accordingly, by defending the host against intracellular pathogens, autophagy contributes to the maintenance of the intestinal homeostasis [110]. Autophagy has been involved in IBD etiology following the discovery of susceptibility polymorphisms in autophagy-associated genes. In mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and epithelial cell lines, AIEC infection induced autophagy leading to the capture of AIEC by the autophagy machinery and consequently, to the limitation of AIEC intracellular replication [111]. However, in cells knockdown for ATG16L1, protein required for the formation of autophagosome, or IRGM, necessary for the initiation of autophagy, autophagy was impaired and AIEC LF82 replicated intracellularly. The same results were observed in cells expressing the ATG16L1 CD-associated allele. Moreover, the replication and survival of other *E. coli* strains were not impacted in autophagy-deficient cells (*Atg5*<sup>-/-</sup>). These results demonstrate that autophagy specifically limits AIEC survival and intracellular replication in epithelial cells and that CD-associated variant impairs this regulation leading to the persistence of AIEC (Figure 1). The activation of the EIF2AK4-EIF2A-ATF4 autophagy pathway by AIEC infection led to the binding of ATF4 to the promoters of several autophagy genes and to the induction of their expression leading to bacterial clearance and controlled inflammatory response [112]. In vivo, following AIEC infection, *eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice did not activate autophagy in IECs and presented increased AIEC intestinal colonization and inflammation compared to WT mice. This pathway was observed as downregulated in ileal biopsies of inflamed patients compared to noninflamed CD patients demonstrating that activation of this pathway and thus, autophagy contributes to controlling the AIEC intracellular replication, while defects in the activation of this pathway could contribute to the active disease.

NOD2, a gene associated with CD, is a cytoplasmic PRR recognizing muramyl dipeptide of bacteria which has been linked to autophagy since it recruits ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry, leading to the activation of autophagy [113,114]. CD-associated NOD2 variants impair this response. In NOD2 overexpressing Caco-2 cells, AIEC infection led to a stronger increase in ATG16L1 protein expression associated with a decrease in AIEC survival and of pro-inflammatory cytokines release compared to WT Caco-2 cells [115]. These results highlight the important role of NOD2 in the activation of autophagy and consequently in the promotion of AIEC clearance. Another protein important in the regulation of NOD2 and autophagy is the intermediate filament protein vimentin expressed on the surface of mesenchymal cells. This protein is an important regulator of NOD2 as vimentin interacts with NOD2 through the leucine-rich repeat (LRR) domain of NOD2 allowing its recruitment to the plasma membrane. This interaction is disrupted with CD-associated variants of NOD2 which leads to a cytosolic mislocalization of NOD2 associated with the inhibition of NOD2-dependent autophagy, favoring AIEC survival in vitro [116,117].

Monocyte-derived macrophages (MDM) from CD patients present higher levels of internalized AIEC and are unable to restrict AIEC intracellular replication, leading to disordered inflammatory



response compared to MDM from ulcerative colitis patients or healthy controls [118,119]. In THP-1 macrophages, AIEC LF82 infection induced the recruitment of the autophagy machinery at the site of entry of the bacteria and functional autophagy limited AIEC replication [120]. However, impaired expression of CD-associated genes *ATG16L1* or *IRGM* in THP-1 macrophages and *NOD2* in *NOD2*<sup>-/-</sup> murine peritoneal macrophages led to an increased AIEC intracellular replication and to the secretion of IL-6 and TNF- $\alpha$  upon AIEC LF82 infection [120]. A more recent study demonstrated that macrophage defect to control intracellular AIEC in CD was linked to autophagy-related polymorphisms in *IRGM* and *ULK-1* genes [121]. Therefore, in CD patients, AIEC might take advantage of autophagy deficiency to persist and replicate in macrophages leading to increased pro-inflammatory response.

### 5.5.2. Role of micro-RNAs in the Control of AIEC Replication

It is recognized that miRNAs can play a role in CD susceptibility, and subsets of dysregulated miRNAs have been identified in non-inflamed colonic mucosa of IBD patients suggesting their potential involvement in CD, in the onset or relapse of inflammation [94,122]. Brest et al. demonstrated that the miR-196 was overexpressed in inflammatory intestinal epithelium of CD patients and correlated with decreased expression of *IRGM*. *In vitro*, this miRNA downregulated *IRGM* but not the risk-associated variant, demonstrating the allele specificity of miR-196 [123]. Lu et al. demonstrated that, *in vitro*, the miRNAs MIR106B and MIR93 downregulated *ATG16L1* leading to the inhibition of autophagy and to an impairment in the removal of AIEC in epithelial cells, whereas miRNAs inhibitors rescued the expression of *ATG16L1* and autophagy [124]. Another study demonstrated that AIEC infection upregulated levels of miR-30c and miR-130a in T84 cell line through the activation of the NF- $\kappa$ B pathway. miR-30c and miR-130a, respectively, targeted *ATG5* and *ATG16L1* that led to the inhibition of autophagy and increased AIEC intracellular replication [125]. In CEABAC10 mice, AIEC infection induced the same effects, and the inhibition of murine miR-30c and miR-130a restored the expression of *ATG5* and *ATG16L1* leading to efficient autophagy and reduced AIEC intracellular replication and pro-inflammatory response. This study suggests that AIEC could reduce autophagy in host cells through the manipulation of miRNAs pathway to favor their intracellular survival (Figure 1). Moreover, in both studies, an inverse correlation between the levels of MIR160B and *ATG16L1* [124] and between miR-30c, miR-130a, and *ATG5*, *ATG16L1* [125] in the mucosa of CD patients has been observed strengthening the link between miRNAs and autophagy. Furthermore, a recent study analyzed the content of exosomes to better understand the increase in AIEC replication in cells receiving exosomes released from AIEC-infected cells. This work demonstrated that the miRNAs miR-30c and miR-130a, inhibiting autophagy, were increased in the exosomes released from AIEC LF82-infected cells compared to exosomes released from uninfected cells. These miRNAs were transferred *via* exosomes to recipient cells and targeted *ATG5* and *ATG16L1* inhibiting autophagy and promoting AIEC intracellular replication [126]. Hence, AIEC could also inhibit autophagy in neighboring cells through exosomes-dependent transfer of miRNAs from infected to recipient cells.

### 5.5.3. Role of SUMOylation in the Control of AIEC Replication

AIEC can also modulate autophagy by impairing SUMOylation, a post-translational modification in which ubiquitin-like polypeptides of 10 kDa, SUMOs, are linked to target proteins [127]. SUMOylation of protein seems to be necessary to control intracellular survival of pathogens such as *Shigella flexneri* and *Listeria monocytogenes* [128–130]. A recent study investigated whether AIEC infection impacted SUMOylation of IECs. *In vitro*, inhibition of SUMOylation inhibited autophagy leading to an increased AIEC intracellular replication and AIEC-induced inflammation demonstrating the important role of SUMOylation to control intracellular AIEC *via* autophagy. AIEC infection induced a decrease in the levels of SUMO-conjugated proteins in T84 cells and in IECs of CEABAC10 mice through the upregulation, upon infection, of miR-18 that targeted *PIAS* mRNA encoding a protein involved in SUMOylation [131]. The inhibition of this miRNA restored the expression of *PIAS* and limited the AIEC

intracellular replication demonstrating that AIEC bacteria are able to manipulate host SUMOylation to inhibit autophagy in order to favor their intracellular replication.

In conclusion, autophagy is an important player in the control of AIEC colonization by preventing intracellular replication. Genetic polymorphisms as well as AIEC themselves, through the upregulation of miRNAs or the manipulation of host SUMOylation, can impact its efficacy and promote AIEC persistence in the gut of CD patients.

## 6. AIEC in the Lumen

As mentioned above, the presence of AIEC in healthy controls implies that a specific environment is necessary to favor AIEC implantation within ileal mucosa of CD patients. In the lumen, AIEC are not only in contact with the gut microbiota but also with diverse nutrients and molecules, creating a specific intestinal environment that can impact the intestinal microbiota and favors AIEC virulence and colonization.

### 6.1. Intestinal Environment Favoring AIEC Virulence and Colonization

#### 6.1.1. Regulation of Virulence Genes by Luminal Molecules

The expression of the virulence gene *lpf* coding for LPF and the expression of the *gipA* gene are promoted by the presence of bile salts in the growth medium facilitating the interaction of the bacteria with PP [66,102]. Moreover, it has been demonstrated that the presence of bile salts induced ethanolamine metabolism in AIEC LF82 strain and that the bacteria was able to use ethanolamine as a nitrogen source conferring a competitive advantage for AIEC strains in the intestinal environment [132,133] (Figure 1). Duboc et al. demonstrated a fecal dysmetabolism of bile acids in IBD patients linked to dysbiosis. IBD-associated microbiota presented impaired activities of deconjugation, transformation, and desulfation leading to increased levels of primary conjugated bile acids and decreased levels of secondary bile acids, the latter presenting anti-inflammatory effects in vitro [134]. Hence, bile salts seem to constitute environmental signals that might be used by AIEC to promote their colonization and seem to represent a selective advantage increasing AIEC fitness in the gut. Based on the work of Duboc et al., we can hypothesize that these signals might be mediated by primary bile acids following dysmetabolism in CD patients.

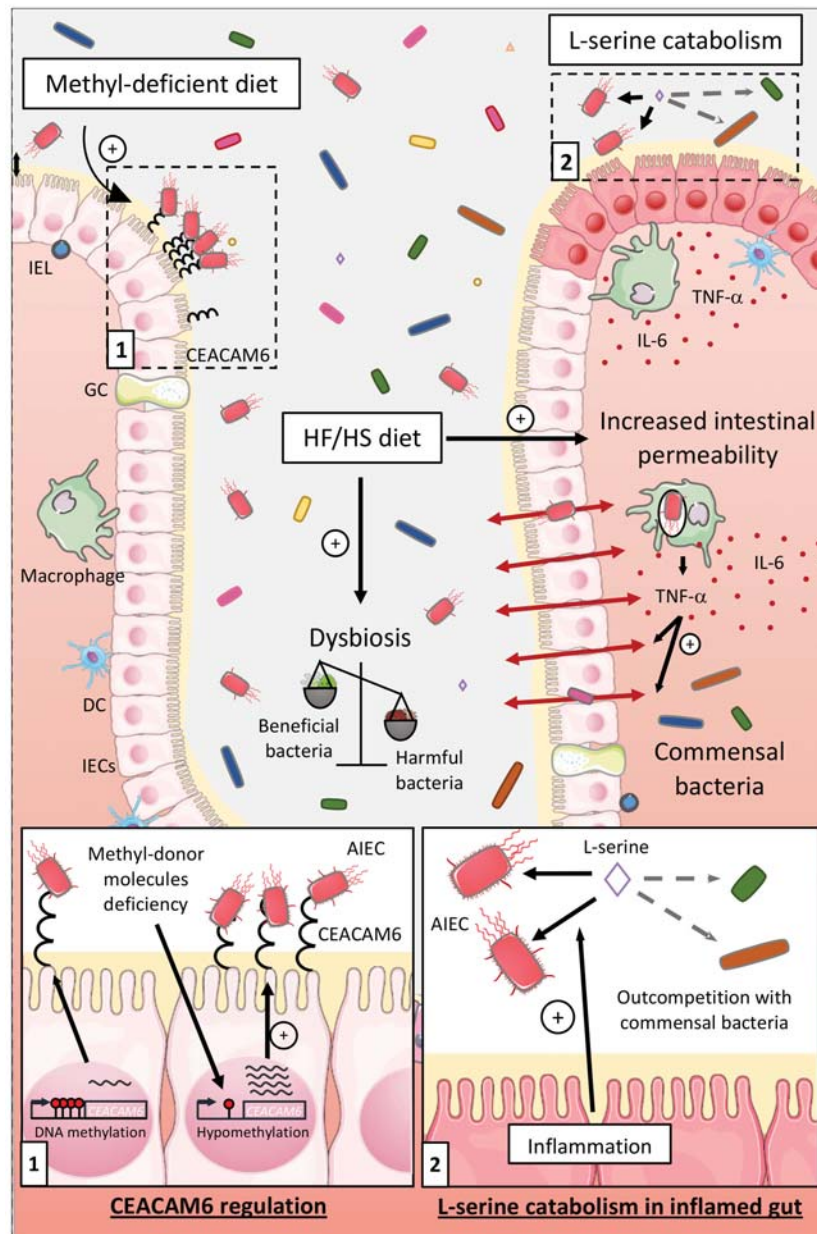
Bacteria of the intestinal microbiota can produce short-chain fatty acids (SCFA) through the degradation of undigested polysaccharides and resistant starches. The major SCFA produced are butyrate, acetate, and propionate and are known for their anti-inflammatory effects [135,136]. Besides, propionic acid (PA) is commonly used in agriculture because of its antimicrobial properties [137,138]. Yet, a recent study demonstrated that exposure of AIEC to PA in vitro and in vivo (through PA supplementation in drinking water of mice) exacerbated the AIEC phenotype (increased ability to adhere to, to invade IECs, and to form biofilms) and promoted AIEC colonization and long-term persistence in vivo (Figure 1). RNA-seq analysis revealed that PA induced a specific transcriptomic program, with induction of genes involved in biofilm formation, stress responses, metabolism, membrane integrity, and transport of alternative carbon sources. Interestingly, the virulence phenotype induced by PA was reversed after the removal of PA. These results not only highlight the potential risks of the use of PA as antimicrobial, especially in the context of AIEC colonization, but also show that AIEC evolved to take advantage of the molecules found in GI tract to outcompete with microorganisms of the microbiota [139].

#### 6.1.2. Influence of the Diet on the Ability of AIEC to Colonize in Intestinal Mucosa

The gut environment can also be impacted by the diet, especially in people living in developed countries having a Western lifestyle. Western diet, enriched in total fat, animal proteins, n-6 polyunsaturated fatty acids, and refined sugars, have been associated with a high risk to develop CD [12–14]. The object of several studies was to better catch the impacts of a HF/HS diet on the intestinal



microenvironment composition and on AIEC infection. In CEABAC10 mice, a HF/HS diet (used as a Western diet) induced dysbiosis with a distinctive enrichment in *E. coli* population. Moreover, this diet increased intestinal permeability, decreased mucus layer thickness, and decreased SCFA concentration and SCFA receptor GPR43 expression. Hence, the HF/HS diet induced a low-grade inflammation and facilitated colonization of the gut mucosa by AIEC in a microbiota-dependent manner [81,140] (Figure 2).



**Figure 2.** Impact of the diet and intestinal inflammation on AIEC virulence and colonization. Western diet consumption induces dysbiosis, decreases the mucus layer thickness, and increases intestinal permeability favoring bacterial translocation across the epithelial layer. All these effects create a low-grade intestinal inflammation and favor AIEC colonization. In addition, a diet deficient in methyl-donor molecules leads to hypomethylation of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) promoter and its abnormal expression promoting AIEC gut implantation (1). The catabolism of L-serine, whose concentration depends on dietary intake, is promoted in inflamed gut increasing AIEC competitive fitness (2). DC, dendritic cell; GC, goblet cell; IECs, intestinal epithelial cells; IEL, intraepithelial lymphocytes; IL-6, interleukin 6; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha.

CD patients frequently present deficiencies in methyl-donor molecules such as folate (vitamin B9) and vitamin B12. As we identified the AIEC receptor gene *CEACAM6* as regulated in a DNA methylation-dependent manner, we suggested that methyl-deficient diet could favor its expression and AIEC intestinal colonization. *CEACAM6* promoter was hypomethylated in CEABAC10 transgenic mice colonic mucosa fed a low methyl diet leading to an abnormal gut expression of the *CEACAM6* receptor favoring AIEC colonization [60] (Figure 2). These observations show that the diet composition can modulate key gene expression in the host, favoring the encroachment of AIEC bacteria to intestinal mucosa.

### 6.1.3. Influence of the Nutrients and Carbon Sources on the Fitness of AIEC

Kitamoto and colleagues recently reported that inflammation-induced blooms of *E. coli* pathobionts was significantly blunted when amino acids, particularly L-serine, were removed from the diet. The authors reported that the metabolism of AIEC shifted toward the catabolism of L-serine in the inflamed gut so as to maximize AIEC growth potential and to outcompete with commensal bacteria, which was not observed in noninflammatory condition [141] (Figure 2). Interestingly, Elhenawy et al. assessed the adaptive evolution of AIEC in a murine model of chronic colonization across multiple hosts and transmission events. In this model, an ancestor AIEC strain was transited in the gut of different mice to study its evolution under gastrointestinal conditions, and it led to the selection of isolates able to use acetate, a SCFA, as a carbon source. This isolate presented a faster generation time and outcompeted the ancestor strain in co-infected mice demonstrating that the use of acetate increases AIEC fitness *in vivo* [49] (Figure 1). Moreover, improved acetate utilization is more common among *E. coli* isolates from CD patients compared to healthy controls suggesting that within the host, AIEC evolved differently than commensal strains and acquired metabolic advantage.

As regards all these observations, the effect of diet on intestinal homeostasis and on AIEC virulence shows that dietary intervention, modifying the availability of luminal nutrients, could be used, along with pharmacological treatments, to limit AIEC overgrowth and implantation in intestinal mucosa of CD patients. At this time, exacerbation of AIEC phenotype has only been demonstrated with PA, but similar effects might be observed with other dietary molecules, notably polluting molecules such as titanium dioxide, TiO<sub>2</sub>, or dietary emulsifiers. To study the effect of these compounds on AIEC virulence would be noteworthy, as they appear to be largely present in processed food and knowing that some detrimental effects of emulsifiers on the intestinal microbiota have already been described [142,143].

### 6.2. Impact of AIEC Infection on Microbiota Composition

AIEC can take advantage of the presence of a dysbiosis to colonize. For example, the use of antibiotics, leading to dysbiosis, in a mouse model mimicking CD susceptibility is needed to obtain AIEC colonization *in vivo* [29]. Moreover, *in vivo*, prior AIEC colonization worsened the inflammatory response and disease outcome following *Salmonella* Typhimurium infection. Interestingly, this was related with the expansion of the AIEC population and a delay in the recovery, which indicates that people carrying AIEC might be at a greater risk to develop CD in case of an acute gastroenteritis [144].

AIEC can also detrimentally impact the intestinal microbiota. As an example, TLR5-deficient (T5KO) mice developed spontaneous colitis in part due to the inability to manage proteobacteria [145,146]. In this genetically predisposed mouse model, infection of germ-free mice with the AIEC reference strain LF82 drove chronic gut inflammation associated with alterations in gut microbiota composition including a loss in species diversity. Moreover, increased levels of flagellin and LPS in the feces have been noticed compared to WT and uninfected T5KO mice, flagellin and LPS having a great potential to activate innate immune response [30]. These microbiota modifications seemed independent of intestinal inflammation suggesting that AIEC might instigate colitis in T5KO mice following alterations of microbiota composition that increase its pro-inflammatory potential. To improve the understanding of how microbiota alterations might trigger colitis, Chassaing et al. used WT and T5KO mice harboring

the “Altered Schaedler Flora” (ASF) microbiota, a community of eight microorganisms devoid of pathogenic/pathobiont bacteria that coexist in the gut and favor the development of normal intestinal immune system [147]. Unlike WT ASF mice, AIEC-infected T5KO ASF mice presented alterations in microbiota composition associated with elevated levels of LPS and flagellin, and these mice developed only a modest low-grade inflammation compared to the previous study [148]. This result confirms the fact that AIEC can alter microbiota composition but suggests that a complex dysbiotic microbiota is necessary for the development of robust inflammation.

Another mouse model exhibiting autophagy defects (Tg/eif2ak4<sup>-/-</sup>) presented an alteration of microbiota composition. In this model, AIEC infection resulted in modifications of microbiota composition and development of gut inflammation [149]. However, alterations of the microbiota composition preceded the development of the gut inflammation demonstrating that in genetically predisposed hosts, AIEC infection and colonization may alter microbiota composition favoring the development of intestinal inflammation.

Thence, the intestinal environment, modulated by luminal molecules and by the diet, is an important actor during AIEC colonization. It can promote the implantation of AIEC directly by driving the expression of different virulence factors or indirectly by impacting the composition of the intestinal microbiota, not to mention that AIEC themselves can detrimentally alter the intestinal microbiota. All these factors promote the persistence of AIEC in the intestinal lumen.

## 7. Targeting AIEC

The last part of this review will focus on presenting and discussing recent therapeutic strategies, aiming at preventing AIEC implantation/persistence, which have shown beneficial effects in preclinical models of CD or which are currently tested in clinical trials.

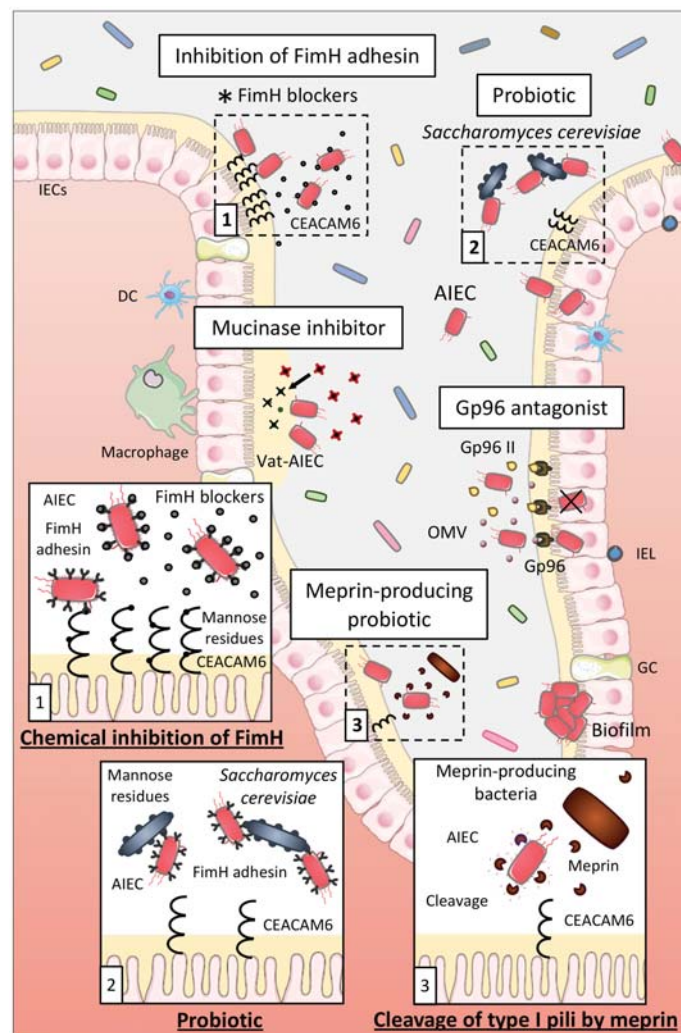
### 7.1. Inhibition of AIEC–IECs Interaction

#### 7.1.1. Probiotics

Probiotics are living microorganisms having a beneficial impact on the health when administered in adequate amounts, whereas prebiotics are dietary compounds inducing the growth or activity of beneficial microorganisms. AIEC survival and growth were decreased upon coculture with *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. reuteri* 1063, and the prebiotic inulin, whereas the prebiotic arabinoxylans lowered AIEC adhesion to mucin *in vitro* [150]. In the simulated mucosal environment (M-SHIME), two compartments exist: a luminal compartment and a mucosal compartment due to the addition of mucin-covered microcosms in the suspension, and in this way, generating a luminal and mucosal microbiota. *L. reuteri* 1063, arabinoxylans, and inulin decreased the colonization of AIEC in the mucus, whereas AIEC numbers in the luminal environment were unchanged. These results were associated with some changes in the microbiota composition of the mucus. Thence, the mucosal microbiota might be modulated by pro- and prebiotic *in vitro* to decrease AIEC colonization in the mucus and thus possibly limiting AIEC interaction with host cells. However, further studies should be performed to determine if similar results are obtained in *in vivo* models and if administration of such prebiotic or probiotic strains in CD patients might be a suitable therapeutic approach.

Probiotics able to inhibit the interaction between AIEC and host cells might represent a good therapeutic option for AIEC-positive CD patients. Preincubation of Intestine-407 cells with the probiotic strain *E. coli* Nissle 1917 prior to infection with AIEC strains or coinubation of *E. coli* Nissle 1917 with AIEC strains strongly inhibited the ability of AIEC to adhere to and to invade Intestine-407 cells, highlighting that *E. coli* Nissle 1917 could be efficient in patients with CD to prevent or limit AIEC colonization [151]. Sivignon et al. studied the probiotic effect of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 on AIEC ability to interact with IECs. Yeasts present a high content of mannose residues on their cell wall that can be recognized by type 1 pili of bacteria. *S. cerevisiae* CNCM I-3856 strongly inhibited adhesion of AIEC LF82 to IECs in culture and to isolated enterocytes from CD patients,

through the type-1 pili-mediated agglutination of AIEC bacteria to the yeast [152]. In CEABAC10 mice infected with AIEC LF82, *S. cerevisiae* CNCM I-3856 and yeast derivatives decreased AIEC gut colonization and prevented the increase of intestinal permeability and the release of pro-inflammatory cytokines. These results demonstrate that *S. cerevisiae* CNCM I-3856 presents beneficial effects which are not dependent of its viability but which are possibly driven by the inhibition of the FimH/CEACAM6 interaction (Figure 3). Hence, *S. cerevisiae* could be a good therapeutic option for CD patients already colonized or susceptible to be colonized by AIEC.



**Figure 3.** Strategies to prevent AIEC colonization in CD patients. Anti-adhesive molecules inhibiting the FimH adhesin (1) or a probiotic strain such as *Saccharomyces cerevisiae* containing mannose residues in its cell wall (2) can inhibit the FimH–CEACAM6 interaction through competition by binding to bacterial FimH. Meprin-producing probiotic strain could limit AIEC interaction with IECs through the meprin-mediated cleavage of AIEC type I pili (3). Other strategies are also suggested as interesting to prevent AIEC colonization such as the use of Gp96 antagonist to block the OmpA-Gp96 interaction or the use of a mucinase inhibitor to prevent mucus degradation and AIEC encroachment. \* Star shows the AIEC targeting approach currently under investigation in a clinical trial. DC, dendritic cell; GC, goblet cell; IECs, intestinal epithelial cells; IEL, intraepithelial lymphocytes.

### 7.1.2. Inhibition of AIEC Adhesion Using Chemical Compounds

The FimH-CEACAM6 interaction, in which the FimH adhesin interacts with the mannose residues of the CEACAM6 receptor expressed at the surface of IECs, is one of the most studied since it favors AIEC gut implantation. Therefore, researches focused on the development of antiadhesive molecules



to saturate the carbohydrate recognition domain of FimH and thus inhibiting this interaction to limit AIEC colonization. For example, thiazolylaminomannosides and *n*-heptyl  $\alpha$ -D-mannose (HM)-based glycopolymers presented high affinity for FimH and were  $10^2$  and  $10^4$ – $10^6$  times more potent than HM and D-mannose (well-known antagonists of FimH), respectively, to inhibit AIEC LF82 adhesion to IECs in vitro. Ex vivo, these compounds also prevented AIEC LF82 adhesion to colonic tissue of CEABAC10 at very low concentrations demonstrating their strong antiadhesive potential [153–155]. Sivignon et al. additionally demonstrated that heptylmannoside derivatives strongly impaired the ability of adhesion of AIEC LF82 to T84 cells and reduced the amount of AIEC in feces and associated to the mucosa in AIEC LF82-infected CEABAC10 mice. Moreover, treatment with these compounds decreased the severity of colitis and intestinal inflammation induced by AIEC LF82 in these mice. Heptylmannoside derivatives are shown as presenting strong antiadhesive effects in vitro and protect in vivo against colitis implying that they could be interesting compounds to treat AIEC-colonized CD patients [156]. Similar results were obtained with other analogues of HM and heptylmannoside grafted on cellulose nanofibers [157,158]. Targeting FimH with antiadhesive molecules is consequently a promising method to limit AIEC adhesion to IECs (Figure 3). This strategy is currently under evaluation in a clinical trial using the FimH blocker EB8018/TAK-018 molecule to evaluate its effect on postoperative endoscopic recurrence in 96 postoperative participants with CD (phase 2a, NCT03943446).

### 7.1.3. Other Strategies

IECs express several types of endo- and exoproteases to protect the host against bacterial colonization. Particularly, meprin induced the proteolytic cleavage of type 1 pili of AIEC LF82 bacteria that impaired their ability to bind mannose residues, like those present on host receptors, explaining the reduced abilities of AIEC LF82 strain pretreated with meprin to adhere to and to invade T84 cells [159]. Moreover, levels of meprin are decreased in patients with ileal CD. The increase of the level of meprin in CD patients through the administration of purified meprin or through meprin-producing probiotic strains could then be an interesting strategy to disrupt the FimH-CEACAM6 interaction to limit AIEC adhesion to IECs and gut colonization (Figure 3).

Moreover, the OmpA-Gp96 interaction promotes AIEC invasion through the delivery of proteins into the host cells [70,71]. A good therapeutic option to inhibit AIEC colonization could be in this way to block this interaction. An antagonist of Gp96 exists, the synthetic peptide Gp96-II, and protected mice against intestinal inflammation in vitro and in vivo [160]. It could be interesting to test this antagonist in a context of AIEC infection to determine if it leads to the disruption of OmpA-Gp96 interaction and to the inhibition of AIEC colonization in vitro and in vivo while seeking for new Gp96 antagonists at the same time (Figure 3).

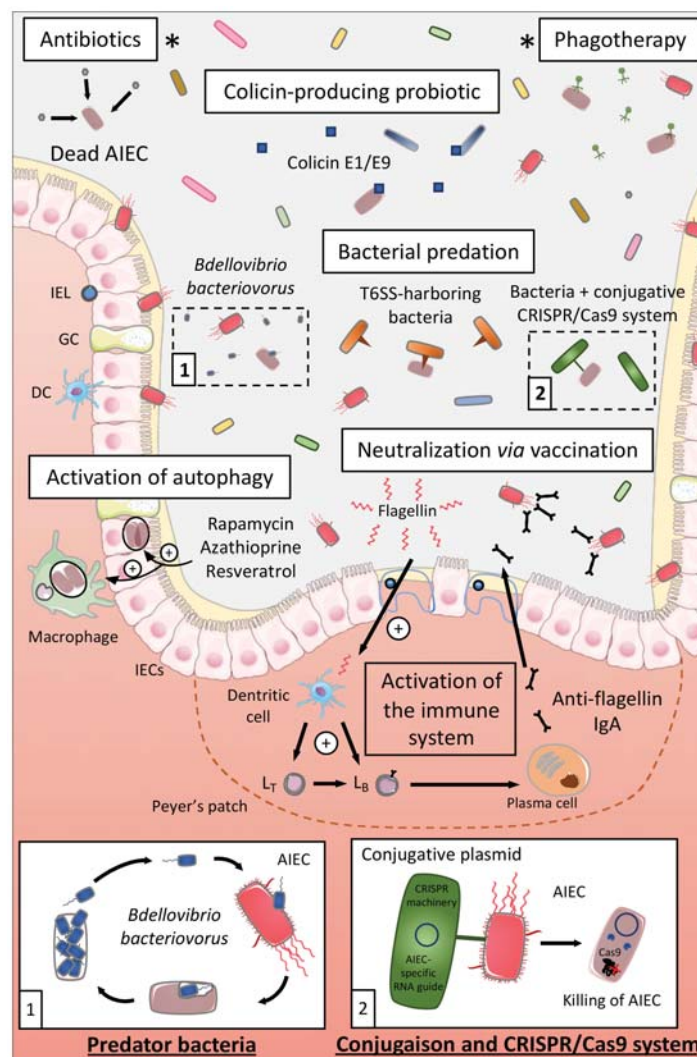
In intestinal mucosa of CD patients, increase in relative abundance of well-known mucus degraders, particularly *Ruminococcus gnavus*, which secretes glycosidases, is frequently observed [161]. In CEABAC10 mice, Western diet induced a dysbiosis, comparable with what is observed in CD patients, with an increase in the mucin-degrading bacterium *Ruminococcus*, allowing AIEC bacteria to better colonize the gut mucosa [81]. Therefore, mucins degradation in the gut may rely on the cooperative action of several microbial species characterized as “mucin-degraders.” Interestingly, AIEC secrete a serine mucin-protease, Vat-AIEC, which is more frequently found in AIEC than in non-AIEC strains and promotes AIEC encroachment in the gut, leading in this manner to dysbiosis and chronic inflammation [46]. It turns out that developing new antivirulence strategies, such as mucinase inhibitors, could also represent an effective therapeutic option to better manage CD patients colonized by AIEC (Figure 3).

## 7.2. Elimination of AIEC

### 7.2.1. Antibiotics

Antibiotics appear like the first logical approach to manipulate the microbiota of CD patients and eliminate AIEC, and several antibiotics have been tested to treat CD such as ciprofloxacin,

aminoglycosides, or rifaximin [162,163] (Figure 4). A study revealed in an interesting way that rifaximin reduced the adhesion and invasion abilities of AIEC strains to colonic T84 epithelial cells and limited the pro-inflammatory cytokine IL-8 secretion, through regulation of virulence gene expression and motility, independently of its antimicrobial effect [164]. Based on these preclinical data, a double-blind randomized clinical trial (THEOREM, phase 2, NCT02620007) aiming at evaluating the effect of a 12-week treatment with ciprofloxacin and rifaximin on endoscopic remission in AIEC-colonized patients with ileal CD is currently ongoing.



**Figure 4.** Strategies to eliminate AIEC in Crohn's disease (CD) patients. AIEC bacteria could be killed by some antibiotics but they could also be eliminated by colicin-producing probiotic strain or bacteriophages specifically targeting AIEC. Some strategies of bacterial predation are also under study where AIEC would be specifically targeted by predator bacteria (1), T6SS-harboring bacteria, or by bacteria harboring the conjugative clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/Cas9 machinery with a RNA guide specific of AIEC (2). Activation of autophagy with pharmacological drugs in CD patients are also studied to promote AIEC clearance. Finally, a vaccination approach based on flagellin administration might be a mean to neutralize AIEC bacteria *via* the production of anti-flagellin IgA. \* Stars show the AIEC targeting approaches currently under investigation in clinical trials. DC, dendritic cell; GC, goblet cell; IECs, intestinal epithelial cells; IEL, intraepithelial lymphocytes; IgA, immunoglobulin A; L<sub>B</sub>, lymphocyte B; L<sub>T</sub>, lymphocyte T; T6SS, type VI secretion system.



### 7.2.2. Use of Colicin

Colicins are the best-characterized family of bacteriocins, namely, highly selective species-specific antibiotics. Colicins are produced by Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* strains carrying a colicinogenic plasmid. These colicins are able to kill other bacteria through a nuclease activity, pore-forming activity, or through the inhibition of cell wall synthesis [165–167]. Purified colicin E1 and E9 as well as a commensal *E. coli* strain naturally producing E1 colicin presented killing activity against AIEC LF82 biofilms. These E1 and E9 colicins also induced the killing of AIEC bacteria adhering to IECs and of intramacrophagic bacteria in vitro without inducing cell toxicity. The intramacrophagic effect was due to the fact that colicins have access to AIEC-containing compartments within infected macrophages through actin-mediated endocytosis [168]. Hence, colicins might represent a good therapeutic approach to selectively target AIEC in CD. They could be delivered as a purified protein or through a colicin-producing probiotic, an *E. coli* Nissle 1917 strain producing colicin already existing [169] (Figure 4).

### 7.2.3. Phagotherapy

Bacteriophages are viruses able to infect bacteria and are found in diverse environments including the human gastrointestinal tract [170,171]. Bacteriophages are highly specific; they only target a limited number of bacterial strains within given species which limits their impact on the composition of the intestinal microbiota and so far, no evidence that phage therapy causes adverse effects have been reported [172,173]. From three bacteriophages isolated from waste water and able to infect AIEC in vitro and ex vivo, Galtier et al. investigated their potential to decrease AIEC intestinal colonization in vivo (Figure 4). A single-dose bacteriophage cocktail reduced the gut colonization of AIEC LF82 in CEABAC10 mice and in DSS-treated WT mice, bacteriophage treatment reduced the ileal and colonic colonization of AIEC LF82 and decreased the symptoms of DSS-induced colitis over a 2-week period. Lastly, bacteriophages were able to replicate *ex vivo* on ileal biopsies from CD patients infected with AIEC LF82 demonstrating their potential efficacy on intestinal mucosa [174]. The results from an ongoing clinical trial targeting AIEC bacteria in CD patients are expected in June 2021. This phase 2, double-blind, placebo-controlled clinical trial aims at studying the effect of an AIEC-specific bacteriophage cocktail (EcoActive) on disease activity, inflammatory markers (CRP and fecal calprotectin), and AIEC load in a cohort of 30 CD patients (NCT03808103).

### 7.2.4. Bacterial Predation/Competition

#### Bacterial Predation

*Bdellovibrio bacteriovorus* bacterium is a predator of Gram-negative bacteria playing the role of “ecological balancer” in several habitats, and it highly colonizes the intestinal mucosa, especially duodenum and ileum, of healthy human subjects compared to IBD patients [175,176]. In fact, *B. bacteriovorus* migrates and encounters prey bacteria through its long flagellum, then invades the periplasmic space of the prey and replicates through a complex cycle leading to the death of the prey and the release of its progeny [177,178]. *B. bacteriovorus* demonstrated predatory activity against AIEC LF82, in planktonic culture and on preformed and developing biofilms, and decreased AIEC LF82 adhesion to and invasion of Caco-2 cells (Figure 4). In vivo, larvae of *Galleria mellonella* presented an increased survival rate upon AIEC LF82 infection pre-exposed to *B. bacteriovorus* demonstrating that *B. bacteriovorus* limits pathogenicity of AIEC or the host susceptibility to be colonized by AIEC [179]. Therefore, *B. bacteriovorus*, bacterium present in healthy subjects, could represent an interesting therapeutic strategy to limit AIEC overgrowth in CD patients by exploiting a natural process. However, it remains necessary to identify the consequences of the presence of *B. bacteriovorus* on global microbiota composition, especially on Gram-negative bacteria. Indeed, this bacterium could also broadly target Gram-negative bacteria, which may actually open an ecological niche further for AIEC bacteria colonization.

## Type VI Secretion System

The type VI secretion system (T6SS) is a nanoweapon used by Gram-negative bacteria to inject toxic effectors directly into eukaryotic cells or bacteria. T6SS resembles a bacteriophage tail-like structure that is anchored to the bacterial cell envelope through a membrane-associated complex. Effectors are delivered in a one-step contact-dependent manner upon contraction of a sheath propelling a syringe puncturing the target cell [180,181]. Some enteric pathogens use T6SS to kill commensal bacteria and colonize the gut, such as *Salmonella* Typhimurium that killed *Klebsiella oxytoca* favoring its implantation in the gut of mice [182]. On another note, T6SS can also be used by commensal bacteria, notably, *Bacteroides fragilis* used T6SS to antagonize commensal Bacteroidales species and to kill enterotoxigenic *B. fragilis* strains *in vivo* in mice [183,184]. The pathogen *Shigella sonnei* specifically outcompeted *Escherichia coli in vitro* and *in vivo* in mice in a T6SS-dependant manner [185], whereas a recent study demonstrated that it is possible to manipulate the type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* to shuttle chosen proteins, different of canonical effectors [186]. Hence, it would be interesting to discover if some commensal bacteria are able to target AIEC in T6SS-dependent manner in order to develop a highly specific and safe therapeutic option for CD patients. In addition, from the work of Anderson et al. and Wettstadt and Filloux, a hypothesis could be to manipulate the T6SS of a commensal bacterium to deliver toxins specific of AIEC in order to safely eliminate these pathobiont bacteria (Figure 4). As specified above, the use of this strategy should rely on the fact that T6SS specifically targets AIEC bacteria, and not all the Gram-negative bacteria in an unspecific manner, to avoid the bloom of AIEC due to the opening of an ecological niche favorable to AIEC growth. This suggests that the development of strategies specifically targeting AIEC should be encouraged, as proposed below.

## Conjugative Bacteria and CRISPR

Conjugation is one of the most efficient horizontal gene transfer mechanisms used by bacteria to spread pathogenicity islands and antibiotic-resistant genes to neighboring bacteria. A conjugative plasmid has been successfully used to transfer the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) nuclease machinery (Cas9 enzyme + sgRNA) from *E. coli* to *Salmonella enterica*, leading to *Salmonella* killing [187]. This strategy has also been used to selectively remove antibiotic-resistant genes in *Enterococcus faecalis in vitro* and *in vivo* [188]. These results clearly show that a conjugative probiotic strain could be used to deliver the CRISPR-Cas9 system to pathobiont bacteria through the use of a RNA guide targeting specific gene of *E. coli* or more specifically, targeting polymorphisms highly prevalent in AIEC strains (FimH pathoadaptive mutations for example). Our hypothesis is that the use of probiotic bacteria, harboring a conjugative plasmid encoding for CRISPR machinery, and specific RNA guide would lead to the specific and controlled killing of AIEC bacteria without altering other members of the microbiota. This would lead to a precise engineering of complex microbiota with the elimination of very specific strains within a multibacterial environment (Figure 4).

### 7.3. Activation of Autophagy

Upon AIEC infection, autophagy is induced and enables to limit intracellular replication of AIEC and therefore their persistence. But, as described earlier, CD-associated variants exist in autophagy-related genes such as *ATG16L1*, *IRGM*, or *NOD2* impairing autophagy and favoring AIEC intracellular replication and persistence in the gut. Lapaquette et al. demonstrated that physiological (starvation) and pharmacological (rapamycin) induction of autophagy prevented AIEC intracellular replication and pro-inflammatory cytokines release in *NOD2<sup>-/-</sup>* murine macrophages [120]. Azathioprine, a current IBD drug, activated autophagy in THP-1 macrophages *in vitro* enhancing the clearance of intracellular AIEC and reduced the pro-inflammatory response. This drug activated also autophagy in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from pediatric patients even in PBMC presenting a CD-associated variant for *ATG16L1* [189]. Hence, in CD patients presenting polymorphisms in autophagy-associated genes, activation of autophagy with pharmacological drugs

might be an interesting therapeutic solution to limit AIEC persistence and inflammation. In addition, a recent study revealed that resveratrol, a micronutrient present in grapes and wine, boosted autophagy favoring autophagy-dependent clearance of AIEC in vitro in IECs. That would imply that such compound might be also used in CD patients to stimulate autophagy and promote AIEC clearance [190] (Figure 4). On the other hand, it seems important to evaluate the efficacy of pharmacological activation of autophagy in CD patients harboring polymorphisms in autophagy genes before proposing a clinical trial based on this strategy, since these autophagy-activating treatments might not be effective for patients with genetic autophagy defects.

#### 7.4. Nutritional Interventions

In this review, we described many environmental factors favoring the encroachment of AIEC bacteria to the intestinal epithelium. Nutritional interventions are of great interest to limit the colonization of AIEC bacteria and to favor the expansion of beneficial bacteria in the microbiota of CD patients. We previously revealed that a methyl-donor-deficient diet (deficient in folate and vitamin B12) led to an overexpression of CEACAM6 favoring AIEC intestinal colonization. Moreover, Kitamoto and colleagues revealed that the metabolism of AIEC shifted toward the catabolism of L-serine in the inflamed gut in order to maximize AIEC growth, and outcompete with commensal bacteria, and that depletion of the serine from the diet limited AIEC overgrowth under inflammatory conditions. In addition, polysaccharides are commonly added to processed foods to improve palatability, and it has been demonstrated that AIEC exposure to maltodextrin, a polysaccharide derived from starch hydrolysis, induced the expression of type I pili enhancing AIEC LF82 biofilm formation and bacterial adhesion to IECs in vitro [191].

Based on these observations, one dietary strategy could be to supplement the diet of CD patients harboring AIEC bacteria with methyl donor molecules, to prevent CEACAM6 abnormal expression, and to limit the intake in serine and maltodextrin, to prevent the blooming and gut colonization of AIEC. Prebiotics could also be offered to CD patients to favor the growth and activity of protective bacteria which would limit the implantation of AIEC pathobionts; this therapeutic option being supported by the fact that two prebiotics, arabinoxylans and inulin, can repress AIEC from mucus in mucosa-comprising gut model [150].

#### 7.5. Flagellin Vaccination

As already mentioned, increased levels of flagellin in feces are observed upon AIEC infection in genetically predisposed T5KO mice [30]. Flagellin is a known trigger of intestinal inflammatory response through the activation of TLR5 and NLRC4. In this way, stimulating adaptive immunity against flagellin could be a means to reduce AIEC persistence within the gut and to limit the inflammation. Weekly administration of flagellin to WT mice resulted in increased levels of anti-flagellin IgA in the serum and the feces and altered the composition of the gut microbiota associated with increased IgA-coated bacteria, reduced levels of fecal flagellin, and decreased microbiota encroachment [192]. Thus, flagellin administration decreased the pro-inflammatory potential of the microbiota and the presence of flagellated bacteria. Moreover, flagellin administration protected WT mice against a colitis induced by immune dysregulation (injection of IL-10 receptor-neutralizing antibody). Based on these data, it would be interesting to test if the strong anti-flagellin IgA response following administration of flagellin promotes the elimination of AIEC and reduces the inflammatory response in vivo upon AIEC infection (Figure 4). Of note, AIEC bacteria have been shown as highly targeted by IgA in CD-associated spondyloarthritis patients' microbiota, reinforcing the hypothesis that such a flagellin vaccine-based strategy could benefit CD patients [193].

In conclusion, several promising therapeutic approaches exist whose efficacy has been demonstrated in in vitro and in vivo models and some of them are currently under validation in ongoing clinical trials. Further studies need to be conducted to deepen the achieved results and to check the safety of such treatments while new strategies are further proceeded.

## 8. Future Directions

Many studies have clearly shown the association between the abnormal prevalence of AIEC bacteria in CD patients and the onset of the disease, mostly in industrialized countries. In contrast, very few studies highlighted the presence of these pathobiont bacteria in “in-development” countries such as in South East Asia and Middle East countries, despite the huge increase in the incidence of IBD during the last 10 years. It seems important to evaluate whether AIEC bacteria are common actors in CD all around the world.

One important point in the study of AIEC is the phenotypical characterization of these bacteria. To date, this characterization is not well-standardized in all the laboratories around the world. An effort should be done to standardize the experiments aiming at characterizing these strains to obtain robust prevalence test of AIEC in CD population. The phenotypical characterization is a long process and requires time-consuming experiments before concluding whether the isolated bacteria are AIEC or not. Hence, it seems necessary to develop new tool for a simplified and standardized identification of AIEC bacteria. Instead of studying the bacteria itself, AIEC-specific biomarkers expressed by host cells could be identified (which is one of the aims of the MOBIDIC clinical trial). As an example, immune-dominant antigens expressed by AIEC, leading to an important humoral response, could be identified and could help the development of serological assay predictive of the carriage of AIEC in CD patients. In the case a humoral response specific to AIEC bacteria would exist, future researches could focus on the development of vaccinal therapies to prevent AIEC overgrowth.

Finally, preclinical models of CD confirmed the causal or contributing role of AIEC bacteria to the development of CD. However, showing that specifically removing AIEC from intestinal mucosa (as performed in many ongoing clinical trials described above) in CD patients limits the symptoms and relapses of the disease is necessary to validate the role of these bacteria in CD and to propose AIEC targeting as a relevant therapy in CD.

To conclude, efforts to better understand the physiology of these bacteria and to elucidate their exact role in CD need to be pursued. It will not only improve diagnostic approaches but will also offer new therapeutic arsenal to propose personal therapies to CD patients colonized by pathobiont AIEC bacteria.

**Author Contributions:** Writing and original draft preparation were performed by M.C. and J.D.; review and editing were performed by M.C., J.D., and N.B. This work was supervised by J.D. and N.B. and funding acquisition was obtained by J.D. and N.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie, Inserm (UMR 1071), INRAe (USC-2018), by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, “Contrat doctoral,” ECO201906008953) and by the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25), I-SITE project (CAP 2025) of the University of Clermont Auvergne. The funders had no role in the preparation of the manuscript.

**Acknowledgments:** We would like to thank Aurélie Mesclier-Fouré (from A To Language) for English editing.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## Abbreviations

AIEC	Adherent-invasive <i>Escherichia coli</i>
AJC	Apical junctional complex
ASF	Altered Schaedler Flora
ATG16L1	Autophagy Related 16 Like 1
CBD	Chitin-binding domain
CD	Crohn’s disease
CEABAC10	Carcinoembryonic antigen bacterial artificial chromosome 10
CEACAM6	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6
CHI3L1	Chitinase 3-like-1
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeat
DSS	Dextran sulfate sodium

EAEC	Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>
FAE	Follicle-associated epithelium
GI	Gastrointestinal tract
GP2	Glycoprotein 2
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HF/HS	High-fat/high sugar
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1
HM	<i>n</i> -Heptyl $\alpha$ -D-mannose
IBD	Inflammatory bowel disease
IECs	Intestinal epithelial cells
IL	Interleukin
IRGM	Immunity-related GTPase family M
LP	Lamina propria
LPF	Long polar fimbriae
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucin rich repeat
MAMP	Microbe-associated molecular pattern
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDM	Monocyte-derived macrophages
MDP	Muramyl dipeptide
MEF	Mouse embryonic fibroblasts
miRNAs	MicroRNAs
MOBIDIC	MOlecular BIomarkers and Adherent and Invasive <i>Escherichia coli</i> (AIEC) Detection Study in Crohn's Disease Patients
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappa B
NLR	NOD-like receptor
NLRC4	NLR family CARD domain-containing protein 4
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain 2
O-GlcNAc	O-linked $\beta$ -N-acetylglucosamine
OMV	Outer membrane vesicles
PA	Propionic acid
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PP	Peyer's patches
PRR	Pattern recognition receptors
SCFA	Short-chain fatty acids
SNP	Single nucleotide polymorphisms
T5KO	Toll-like receptor 5-deficient
T6SS	Type IV secretion system
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TJ	Tight junctions
TLR	Toll-like receptor
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
Tnseq	Transposon mutagenesis coupled with next-generation sequencing
UC	Ulcerative colitis
WT	Wild-type

## References

1. Crohn, B.B. Regional ileitis: A pathologic and clinical entity. *JAMA* **1932**, *99*, 1323. [[CrossRef](#)]
2. Torres, J.; Mehandru, S.; Colombel, J.-F.; Peyrin-Biroulet, L. Crohn's disease. *Lancet* **2017**, *389*, 1741–1755. [[CrossRef](#)]
3. Hugot, J.P.; Chamaillard, M.; Zouali, H.; Lesage, S.; Cézard, J.P.; Belaiche, J.; Almer, S.; Tysk, C.; O'Morain, C.A.; Gassull, M.; et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **2001**, *411*, 599–603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



4. Ogura, Y.; Bonen, D.K.; Inohara, N.; Nicolae, D.L.; Chen, F.F.; Ramos, R.; Britton, H.; Moran, T.; Karaliuskas, R.; Duerr, R.H.; et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **2001**, *411*, 603–606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Hampe, J.; Franke, A.; Rosenstiel, P.; Till, A.; Teuber, M.; Huse, K.; Albrecht, M.; Mayr, G.; De La Vega, F.M.; Briggs, J.; et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 207–211. [[CrossRef](#)]
6. Parkes, M.; Barrett, J.C.; Prescott, N.J.; Tremelling, M.; Anderson, C.A.; Fisher, S.A.; Roberts, R.G.; Nimmo, E.R.; Cummings, F.R.; Soars, D.; et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 830–832. [[CrossRef](#)]
7. Henderson, P.; Stevens, C. The Role of Autophagy in Crohn's Disease. *Cells* **2012**, *1*, 492–519. [[CrossRef](#)]
8. Thompson, N.P.; Driscoll, R.; Pounder, R.E.; Wakefield, A.J. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: Results of a British twin study. *BMJ* **1996**, *312*, 95–96. [[CrossRef](#)]
9. Orholm, M.; Binder, V.; Sørensen, T.I.; Rasmussen, L.P.; Kyvik, K.O. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand. J. Gastroenterol.* **2000**, *35*, 1075–1081. [[CrossRef](#)]
10. Halfvarson, J.; Jess, T.; Bodin, L.; Järnerot, G.; Munkholm, P.; Binder, V.; Tysk, C. Longitudinal concordance for clinical characteristics in a Swedish-Danish twin population with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2007**, *13*, 1536–1544. [[CrossRef](#)]
11. Mahid, S.S.; Minor, K.S.; Soto, R.E.; Hornung, C.A.; Galandiuk, S. Smoking and inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *Mayo Clin. Proc.* **2006**, *81*, 1462–1471. [[CrossRef](#)]
12. Chapman-Kiddell, C.A.; Davies, P.S.W.; Gillen, L.; Radford-Smith, G.L. Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2010**, *16*, 137–151. [[CrossRef](#)]
13. Chiba, M.; Nakane, K.; Komatsu, M. Westernized Diet is the Most Ubiquitous Environmental Factor in Inflammatory Bowel Disease. *Perm. J.* **2019**, *23*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Levine, A.; Rhodes, J.M.; Lindsay, J.O.; Abreu, M.T.; Kamm, M.A.; Gibson, P.R.; Gasche, C.; Silverberg, M.S.; Mahadevan, U.; Sigall, B.R.; et al. Dietary Guidance for Patients With Inflammatory Bowel Disease from the International Organization for the Study of Inflammatory Bowel Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Sokol, H.; Seksik, P.; Rigottier-Gois, L.; Lay, C.; Lepage, P.; Podglajen, I.; Marteau, P.; Doré, J. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2006**, *12*, 106–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Frank, D.N.; Amand, A.L.S.; Feldman, R.A.; Boedeker, E.C.; Harpaz, N.; Pace, N.R. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 13780–13785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Walker, A.W.; Sanderson, J.D.; Churcher, C.; Parkes, G.C.; Hudspith, B.N.; Rayment, N.; Brostoff, J.; Parkhill, J.; Dougan, G.; Petrovska, L. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol.* **2011**, *11*, 7. [[CrossRef](#)]
18. Fujimoto, T.; Imaeda, H.; Takahashi, K.; Kasumi, E.; Bamba, S.; Fujiyama, Y.; Andoh, A. Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *28*, 613–619. [[CrossRef](#)]
19. Alhaghamhad, M.H.; Day, A.S.; Lemberg, D.A.; Leach, S.T. An overview of the bacterial contribution to Crohn disease pathogenesis. *J. Med. Microbiol.* **2016**, *65*, 1049–1059. [[CrossRef](#)]
20. Sokol, H.; Brot, L.; Stefanescu, C.; Auzolle, C.; Barnich, N.; Buisson, A.; Fumery, M.; Pariente, B.; Le Bourhis, L.; Treton, X.; et al. Prominence of ileal mucosa-associated microbiota to predict postoperative endoscopic recurrence in Crohn's disease. *Gut* **2020**, *69*, 462–472. [[CrossRef](#)]
21. Darfeuille-Michaud, A.; Neut, C.; Barnich, N.; Lederman, E.; Di Martino, P.; Desreumaux, P.; Gambiez, L.; Joly, B.; Cortot, A.; Colombel, J.F. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **1998**, *115*, 1405–1413. [[CrossRef](#)]
22. Darfeuille-Michaud, A.; Boudeau, J.; Bulois, P.; Neut, C.; Glasser, A.-L.; Barnich, N.; Bringer, M.-A.; Swidsinski, A.; Beaugerie, L.; Colombel, J.-F. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* **2004**, *127*, 412–421. [[CrossRef](#)]



23. Baumgart, M.; Dogan, B.; Rishniw, M.; Weitzman, G.; Bosworth, B.; Yantiss, R.; Orsi, R.H.; Wiedmann, M.; McDonough, P.; Kim, S.G.; et al. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J.* **2007**, *1*, 403–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Martinez-Medina, M.; Aldeguer, X.; Lopez-Siles, M.; González-Huix, F.; López-Oliu, C.; Dahbi, G.; Blanco, J.E.; Blanco, J.; Garcia-Gil, L.J.; Darfeuille-Michaud, A. Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: New ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2009**, *15*, 872–882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sepehri, S.; Khafipour, E.; Bernstein, C.N.; Coombes, B.K.; Pilar, A.V.; Karmali, M.; Ziebell, K.; Krause, D.O. Characterization of *Escherichia coli* isolated from gut biopsies of newly diagnosed patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2011**, *17*, 1451–1463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Raso, T.; Crivellaro, S.; Chirillo, M.G.; Pais, P.; Gaia, E.; Savoia, D. Analysis of *Escherichia coli* isolated from patients affected by Crohn's disease. *Curr. Microbiol.* **2011**, *63*, 131–137. [[CrossRef](#)]
27. Dogan, B.; Scherl, E.; Bosworth, B.; Yantiss, R.; Altier, C.; McDonough, P.L.; Jiang, Z.-D.; Dupont, H.L.; Garneau, P.; Harel, J.; et al. Multidrug resistance is common in *Escherichia coli* associated with ileal Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2013**, *19*, 141–150. [[CrossRef](#)]
28. Boudeau, J.; Glasser, A.L.; Masseret, E.; Joly, B.; Darfeuille-Michaud, A. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 4499–4509. [[CrossRef](#)]
29. Carvalho, F.A.; Barnich, N.; Sivignon, A.; Darcha, C.; Chan, C.H.F.; Stanners, C.P.; Darfeuille-Michaud, A. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 2179–2189. [[CrossRef](#)]
30. Chassaing, B.; Koren, O.; Carvalho, F.A.; Ley, R.E.; Gewirtz, A.T. AIEC pathobiont instigates chronic colitis in susceptible hosts by altering microbiota composition. *Gut* **2014**, *63*, 1069–1080. [[CrossRef](#)]
31. Schmitz, J.M.; Tonkonogy, S.L.; Dogan, B.; Leblond, A.; Whitehead, K.J.; Kim, S.C.; Simpson, K.W.; Sartor, R.B. Murine Adherent and Invasive *E. coli* Induces Chronic Inflammation and Immune Responses in the Small and Large Intestines of Monoassociated IL-10<sup>-/-</sup> Mice Independent of Long Polar Fimbriae Adhesin, A. *Inflamm. Bowel Dis.* **2019**, *25*, 875–885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Palmela, C.; Chevarin, C.; Xu, Z.; Torres, J.; Sevrin, G.; Hirten, R.; Barnich, N.; Ng, S.C.; Colombel, J.-F. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut* **2018**, *67*, 574–587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. O'Brien, C.L.; Bringer, M.-A.; Holt, K.E.; Gordon, D.M.; Dubois, A.L.; Barnich, N.; Darfeuille-Michaud, A.; Pavli, P. Comparative genomics of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Gut* **2017**, *66*, 1382–1389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Camprubí-Font, C.; Lopez-Siles, M.; Ferrer-Guixeras, M.; Niubó-Carulla, L.; Abellà-Ametller, C.; Garcia-Gil, L.J.; Martinez-Medina, M. Comparative genomics reveals new single-nucleotide polymorphisms that can assist in identification of adherent-invasive *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* **2018**, *8*. [[CrossRef](#)]
35. Camprubí-Font, C.; Bustamante, P.; Vidal, R.M.; O'Brien, C.L.; Barnich, N.; Martinez-Medina, M. Study of a classification algorithm for AIEC identification in geographically distinct *E. coli* strains. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 8094. [[CrossRef](#)]
36. Forstner, G. Signal transduction, packaging and secretion of mucins. *Annu. Rev. Physiol.* **1995**, *57*, 585–605. [[CrossRef](#)]
37. Mantle, M.; Rombough, C. Growth in and breakdown of purified rabbit small intestinal mucin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **1993**, *61*, 4131–4138. [[CrossRef](#)]
38. Arike, L.; Hansson, G.C. The Densely O-glycosylated MUC2 Mucin Protects the Intestine and Provides Food for the Commensal Bacteria. *J. Mol. Biol.* **2016**, *428*, 3221–3229. [[CrossRef](#)]
39. Derrien, M.; van Passel, M.W.; van de Bovenkamp, J.H.; Schipper, R.G.; de Vos, W.M.; Dekker, J. Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes* **2010**, *1*, 254–268. [[CrossRef](#)]
40. Strugala, V.; Dettmar, P.W.; Pearson, J.P. Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int. J. Clin. Pract.* **2008**, *62*, 762–769. [[CrossRef](#)]
41. Buisine, M.; Desreumaux, P.; Leteurtre, E.; Copin, M.; Colombel, J.; Porchet, N.; Aubert, J. Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. *Gut* **2001**, *49*, 544–551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

42. Moehle, C.; Ackermann, N.; Langmann, T.; Aslanidis, C.; Kel, A.; Kel-Margoulis, O.; Schmitz-Madry, A.; Zahn, A.; Stremmel, W.; Schmitz, G. Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease. *J. Mol. Med.* **2006**, *84*, 1055–1066. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Dorofeyev, A.E.; Vasilenko, I.V.; Rassokhina, O.A.; Kondratiuk, R.B. Mucosal barrier in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2013**, *2013*, 431231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Sicard, J.-F.; Le Bihan, G.; Voegelé, P.; Jacques, M.; Harel, J. Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Elatrech, I.; Marzaioli, V.; Boukemara, H.; Bournier, O.; Neut, C.; Darfeuille-Michaud, A.; Luis, J.; Dubuquoy, L.; El-Benna, J.; My-Chan Dang, P.; et al. Escherichia coli LF82 differentially regulates ROS production and mucin expression in intestinal epithelial T84 cells: Implication of NOX1. *Inflamm. Bowel Dis.* **2015**, *21*, 1018–1026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Gibold, L.; Garenaux, E.; Dalmaso, G.; Gallucci, C.; Cia, D.; Mottet-Auselo, B.; Faïs, T.; Darfeuille-Michaud, A.; Nguyen, H.T.T.; Barnich, N.; et al. The Vat-AIEC protease promotes crossing of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated Escherichia coli. *Cell. Microbiol.* **2016**, *18*, 617–631. [[CrossRef](#)]
47. Barnich, N.; Boudeau, J.; Claret, L.; Darfeuille-Michaud, A. Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol. Microbiol.* **2003**, *48*, 781–794. [[CrossRef](#)]
48. Nakamura, S.; Minamino, T. Flagella-Driven Motility of Bacteria. *Biomolecules* **2019**, *9*, 279. [[CrossRef](#)]
49. Elhenawy, W.; Tsai, C.N.; Coombes, B.K. Host-Specific Adaptive Diversification of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli. *Cell Host Microbe* **2019**, *25*, 301–312. [[CrossRef](#)]
50. Sevrin, G.; Massier, S.; Chassaing, B.; Agus, A.; Delmas, J.; Denizot, J.; Billard, E.; Barnich, N. Adaptation of adherent-invasive E. coli to gut environment: Impact on flagellum expression and bacterial colonization ability. *Gut Microbes* **2018**, 1–17. [[CrossRef](#)]
51. Bevins, C.L.; Salzman, N.H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 356–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **2002**, *415*, 389–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. McPhee, J.B.; Small, C.L.; Reid-Yu, S.A.; Brannon, J.R.; Le Moual, H.; Coombes, B.K. Host Defense Peptide Resistance Contributes to Colonization and Maximal Intestinal Pathology by Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 3383–3393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Boudeau, J.; Barnich, N.; Darfeuille-Michaud, A. Type 1 pili-mediated adherence of Escherichia coli strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **2001**, *39*, 1272–1284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Dreux, N.; Denizot, J.; Martinez-Medina, M.; Mellmann, A.; Billig, M.; Kisiela, D.; Chattopadhyay, S.; Sokurenko, E.; Neut, C.; Gower-Rousseau, C.; et al. Point mutations in FimH adhesin of Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli enhance intestinal inflammatory response. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Barnich, N.; Carvalho, F.A.; Glasser, A.-L.; Darcha, C.; Jantschkeff, P.; Allez, M.; Peeters, H.; Bommelaer, G.; Desreumaux, P.; Colombel, J.-F.; et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 1566–1574. [[CrossRef](#)]
57. Dumych, T.; Yamakawa, N.; Sivignon, A.; Garenaux, E.; Robakiewicz, S.; Coddeville, B.; Bongiovanni, A.; Bray, F.; Barnich, N.; Szunerits, S.; et al. Oligomannose-Rich Membranes of Dying Intestinal Epithelial Cells Promote Host Colonization by Adherent-Invasive E. coli. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 742. [[CrossRef](#)]
58. Barnich, N.; Darfeuille-Michaud, A. Abnormal CEACAM6 expression in Crohn disease patients favors gut colonization and inflammation by adherent-invasive E. coli. *Virulence* **2010**, *1*, 281–282. [[CrossRef](#)]
59. Mimouna, S.; Gonçalves, D.; Barnich, N.; Darfeuille-Michaud, A.; Hofman, P.; Vouret-Craviari, V. Crohn disease-associated Escherichia coli promote gastrointestinal inflammatory disorders by activation of HIF-dependent responses. *Gut Microbes* **2011**, *2*, 335–346. [[CrossRef](#)]
60. Denizot, J.; Desrichard, A.; Agus, A.; Uhrhammer, N.; Dreux, N.; Vouret-Craviari, V.; Hofman, P.; Darfeuille-Michaud, A.; Barnich, N. Diet-induced hypoxia responsive element demethylation increases CEACAM6 expression, favouring Crohn's disease-associated Escherichia coli colonisation. *Gut* **2015**, *64*, 428–437. [[CrossRef](#)]

61. Mizoguchi, E. Chitinase 3-like-1 exacerbates intestinal inflammation by enhancing bacterial adhesion and invasion in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* **2006**, *130*, 398–411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Chen, C.-C.; Pekow, J.; Llado, V.; Kanneganti, M.; Lau, C.W.; Mizoguchi, A.; Mino-Kenudson, M.; Bissonnette, M.; Mizoguchi, E. Chitinase 3-like-1 expression in colonic epithelial cells as a potentially novel marker for colitis-associated neoplasia. *Am. J. Pathol.* **2011**, *179*, 1494–1503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Low, D.; Tran, H.T.; Lee, I.-A.; Dreux, N.; Kamba, A.; Reinecker, H.-C.; Darfeuille-Michaud, A.; Barnich, N.; Mizoguchi, E. Chitin-binding domains of *Escherichia coli* ChiA mediate interactions with intestinal epithelial cells in mice with colitis. *Gastroenterology* **2013**, *145*, 602–612.e9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Chassaing, B.; Rolhion, N.; de Vallée, A.; Salim, S.Y.; Prorok-Hamon, M.; Neut, C.; Campbell, B.J.; Söderholm, J.D.; Hugot, J.-P.; Colombel, J.-F.; et al. Crohn disease-associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 966–975. [[CrossRef](#)]
65. Keita, Å.V.; Alkaissi, L.Y.; Holm, E.B.; Heil, S.D.S.; Chassaing, B.; Darfeuille-Michaud, A.; McKay, D.M.; Söderholm, J.D. Enhanced *E. coli* LF82 Translocation through the Follicle-associated Epithelium in Crohn's Disease is Dependent on Long Polar Fimbriae and CEACAM6 expression, and Increases Paracellular Permeability. *J. Crohns Colitis* **2020**, *14*, 216–229. [[CrossRef](#)]
66. Chassaing, B.; Etienne-Mesmin, L.; Bonnet, R.; Darfeuille-Michaud, A. Bile salts induce long polar fimbriae expression favouring Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* interaction with Peyer's patches. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15*, 355–371. [[CrossRef](#)]
67. Hase, K.; Kawano, K.; Nochi, T.; Pontes, G.S.; Fukuda, S.; Ebisawa, M.; Kadokura, K.; Tobe, T.; Fujimura, Y.; Kawano, S.; et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* **2009**, *462*, 226–230. [[CrossRef](#)]
68. Baranov, V.; Hammarström, S. Carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1), apically expressed on human colonic M cells, are potential receptors for microbial adhesion. *Histochem. Cell Biol.* **2004**, *121*, 83–89. [[CrossRef](#)]
69. Rolhion, N.; Barnich, N.; Claret, L.; Darfeuille-Michaud, A. 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. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 2286–2296. [[CrossRef](#)]
70. Rolhion, N.; Barnich, N.; Bringer, M.-A.; Glasser, A.-L.; Ranc, J.; Hébuterne, X.; Hofman, P.; Darfeuille-Michaud, A. Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive *Escherichia coli* invasion. *Gut* **2010**, *59*, 1355–1362. [[CrossRef](#)]
71. Rolhion, N.; Hofman, P.; Darfeuille-Michaud, A. The endoplasmic reticulum stress response chaperone: Gp96, a host receptor for Crohn disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Gut Microbes* **2011**, *2*, 115–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Cieza, R.J.; Hu, J.; Ross, B.N.; Sbrana, E.; Torres, A.G. The IbeA invasin of adherent-invasive *Escherichia coli* mediates interaction with intestinal epithelia and macrophages. *Infect. Immun.* **2015**, *83*, 1904–1918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Van Opijnen, T.; Bodi, K.L.; Camilli, A. Tn-seq: High-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 767–772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Turner, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 799–809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Peterson, L.W.; Artis, D. Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 141–153. [[CrossRef](#)]
76. Michielan, A.; D'Inca, R. Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators Inflamm.* **2015**, *2015*, 628157. [[CrossRef](#)]
77. Sasaki, M.; Sitaraman, S.V.; Babbin, B.A.; Gerner-Smidt, P.; Ribot, E.M.; Garrett, N.; Alpern, J.A.; Akyildiz, A.; Theiss, A.L.; Nusrat, A.; et al. Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab. Investig.* **2007**, *87*, 1042–1054. [[CrossRef](#)]
78. Wine, E.; Ossa, J.C.; Gray-Owen, S.D.; Sherman, P.M. Adherent-invasive *Escherichia coli*, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 180. [[CrossRef](#)]

79. Denizot, J.; Sivignon, A.; Barreau, F.; Darcha, C.; Chan, H.F.C.; Stanners, C.P.; Hofman, P.; Darfeuille-Michaud, A.; Barnich, N. Adherent-invasive Escherichia coli induce claudin-2 expression and barrier defect in CEABAC10 mice and Crohn's disease patients. *Inflamm. Bowel Dis.* **2012**, *18*, 294–304. [[CrossRef](#)]
80. Assa, A.; Vong, L.; Pinnell, L.J.; Rautava, J.; Avitzur, N.; Johnson-Henry, K.C.; Sherman, P.M. Vitamin D deficiency predisposes to adherent-invasive Escherichia coli-induced barrier dysfunction and experimental colonic injury. *Inflamm. Bowel Dis.* **2015**, *21*, 297–306. [[CrossRef](#)]
81. Martinez-Medina, M.; Denizot, J.; Dreux, N.; Robin, F.; Billard, E.; Bonnet, R.; Darfeuille-Michaud, A.; Barnich, N. Western diet induces dysbiosis with increased E coli in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut* **2014**, *63*, 116–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Hanić, M.; Trbojević-Akmačić, I.; Lauc, G. Inflammatory bowel disease—Glycomics perspective. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2019**, *1863*, 1595–1601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Sun, Q.-H.; Wang, Y.-S.; Liu, G.; Zhou, H.-L.; Jian, Y.-P.; Liu, M.-D.; Zhang, D.; Ding, Q.; Zhao, R.-X.; Chen, J.-F.; et al. Enhanced O-linked GlcNacetylation in Crohn's disease promotes intestinal inflammation. *EBioMedicine* **2020**, *53*, 102693. [[CrossRef](#)]
84. Rieder, F.; Fiocchi, C.; Rogler, G. Mechanisms, Management, and Treatment of Fibrosis in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* **2017**, *152*, 340–350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Small, C.-L.N.; Reid-Yu, S.A.; McPhee, J.B.; Coombes, B.K. Persistent infection with Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli leads to chronic inflammation and intestinal fibrosis. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1957. [[CrossRef](#)]
86. Ellermann, M.; Gharaibeh, R.Z.; Fulbright, L.; Dogan, B.; Moore, L.N.; Broberg, C.A.; Lopez, L.R.; Rothemich, A.M.; Herzog, J.W.; Rogala, A.; et al. Yersiniabactin-Producing Adherent/Invasive Escherichia coli Promotes Inflammation-Associated Fibrosis in Gnotobiotic Il10<sup>-/-</sup> Mice. *Infect. Immun.* **2019**, *87*. [[CrossRef](#)]
87. Imai, J.; Kitamoto, S.; Sugihara, K.; Nagao-Kitamoto, H.; Hayashi, A.; Morhardt, T.L.; Kuffa, P.; Higgins, P.D.R.; Barnich, N.; Kamada, N. Flagellin-mediated activation of IL-33-ST2 signaling by a pathobiont promotes intestinal fibrosis. *Mucosal Immunol.* **2019**, *12*, 632–643. [[CrossRef](#)]
88. Schmitz, J.; Owyang, A.; Oldham, E.; Song, Y.; Murphy, E.; McClanahan, T.K.; Zurawski, G.; Moshrefi, M.; Qin, J.; Li, X.; et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* **2005**, *23*, 479–490. [[CrossRef](#)]
89. Fichtner-Feigl, S.; Fuss, I.J.; Young, C.A.; Watanabe, T.; Geissler, E.K.; Schlitt, H.-J.; Kitani, A.; Strober, W. Induction of IL-13 triggers TGF-beta1-dependent tissue fibrosis in chronic 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis. *J. Immunol.* **2007**, *178*, 5859–5870. [[CrossRef](#)]
90. Gewirtz, A.T.; Navas, T.A.; Lyons, S.; Godowski, P.J.; Madara, J.L. Cutting edge: Bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 1882–1885. [[CrossRef](#)]
91. Zhao, Y.; Shao, F. The NAIP-NLRC4 inflammasome in innate immune detection of bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Immunol. Rev.* **2015**, *265*, 85–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Carvalho, F.A.; Barnich, N.; Sauvanet, P.; Darcha, C.; Gelot, A.; Darfeuille-Michaud, A. Crohn's disease-associated Escherichia coli LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin. *Inflamm. Bowel Dis.* **2008**, *14*, 1051–1060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Abreu, M.T.; Vora, P.; Faure, E.; Thomas, L.S.; Arnold, E.T.; Arditi, M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 1609–1616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Raisch, J.; Darfeuille-Michaud, A.; Nguyen, H.T.T. Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19*, 2985–2996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Mohammadi, A.; Kelly, O.B.; Smith, M.I.; Kabakchiev, B.; Silverberg, M.S. Differential miRNA Expression in Ileal and Colonic Tissues Reveals an Altered Immunoregulatory Molecular Profile in Individuals With Crohn's Disease versus Healthy Subjects. *J. Crohns Colitis* **2019**, *13*, 1459–1469. [[CrossRef](#)]
96. Guo, Z.; Cai, X.; Guo, X.; Xu, Y.; Gong, J.; Li, Y.; Zhu, W. Let-7b ameliorates Crohn's disease-associated adherent-invasive E coli induced intestinal inflammation via modulating Toll-Like Receptor 4 expression in intestinal epithelial cells. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *156*, 196–203. [[CrossRef](#)]



97. Steinbach, E.C.; Plevy, S.E. The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD. *Inflamm. Bowel Dis.* **2014**, *20*, 166–175. [[CrossRef](#)]
98. Naser, S.A.; Romero, C.; Urbina, P.; Naser, N.; Valentine, J. Cellular infiltration and cytokine expression correlate with fistulizing state in Crohn's disease. *Clin. Vaccine Immunol.* **2011**, *18*, 1416–1419. [[CrossRef](#)]
99. Glasser, A.L.; Boudeau, J.; Barnich, N.; Perruchot, M.H.; Colombel, J.F.; 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. [[CrossRef](#)]
100. 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. [[CrossRef](#)]
101. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Vazeille, E.; Chassaing, B.; Buisson, A.; Dubois, A.; de Vallée, A.; Billard, E.; Neut, C.; Bommelaer, G.; Colombel, J.-F.; Barnich, N.; et al. GipA Factor Supports Colonization of Peyer's Patches by Crohn's Disease-associated Escherichia Coli. *Inflamm. Bowel Dis.* **2016**, *22*, 68–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Demarre, G.; Prudent, V.; Schenk, H.; Rousseau, E.; Bringer, M.-A.; Barnich, N.; Tran Van Nhieu, G.; Rimsky, S.; De Monte, S.; Espéli, O. 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.* **2019**, *15*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Bringer, M.-A.; Billard, E.; Glasser, A.-L.; Colombel, J.-F.; Darfeuille-Michaud, A. Replication of Crohn's disease-associated AIEC within macrophages is dependent on TNF- $\alpha$  secretion. *Lab. Investig.* **2012**, *92*, 411–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Van der Grein, S.G.; Nolte-'t Hoen, E.N.M. "Small Talk" in the Innate Immune System via RNA-Containing Extracellular Vesicles. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Greening, D.W.; Gopal, S.K.; Xu, R.; Simpson, R.J.; Chen, W. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**, *40*, 72–81. [[CrossRef](#)]
107. Larabi, A.; Barnich, N.; Nguyen, H.T.T. Emerging Role of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Infectious and Inflammatory Bowel Diseases. *Cells* **2020**, *9*, 1111. [[CrossRef](#)]
108. Bhatnagar, S.; Shinagawa, K.; Castellino, F.J.; Schorey, J.S. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* **2007**, *110*, 3234–3244. [[CrossRef](#)]
109. Carrière, J.; Bretin, A.; Darfeuille-Michaud, A.; Barnich, N.; Nguyen, H.T.T. Exosomes Released from Cells Infected with Crohn's Disease-associated Adherent-Invasive Escherichia coli Activate Host Innate Immune Responses and Enhance Bacterial Intracellular Replication. *Inflamm. Bowel Dis.* **2016**, *22*, 516–528. [[CrossRef](#)]
110. Glick, D.; Barth, S.; Macleod, K.F. Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* **2010**, *221*, 3–12. [[CrossRef](#)]
111. Lapaquette, P.; Glasser, A.-L.; Huett, A.; Xavier, R.J.; Darfeuille-Michaud, A. Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell. Microbiol.* **2010**, *12*, 99–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Bretin, A.; Carrière, J.; Dalmasso, G.; Bergougnoux, A.; B'chir, W.; Maurin, A.-C.; Müller, S.; Seibold, F.; Barnich, N.; Bruhat, A.; et al. Activation of the EIF2AK4-EIF2A/eIF2 $\alpha$ -ATF4 pathway triggers autophagy response to Crohn disease-associated adherent-invasive Escherichia coli infection. *Autophagy* **2016**, *12*, 770–783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Homer, C.R.; Richmond, A.L.; Rebert, N.A.; Achkar, J.-P.; McDonald, C. ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology* **2010**, *139*, 1630–1641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Travassos, L.H.; Carneiro, L.A.M.; Ramjeet, M.; Hussey, S.; Kim, Y.-G.; Magalhães, J.G.; Yuan, L.; Soares, F.; Chea, E.; Le Bourhis, L.; et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 55–62. [[CrossRef](#)]
115. Negroni, A.; Colantoni, E.; Vitali, R.; Palone, F.; Pierdomenico, M.; Costanzo, M.; Cesi, V.; Cucchiara, S.; Stronati, L. NOD2 induces autophagy to control AIEC bacteria infectiveness in intestinal epithelial cells. *Inflamm. Res.* **2016**, *65*, 803–813. [[CrossRef](#)]

116. Henderson, P.; Wilson, D.C.; Satsangi, J.; Stevens, C. A role for vimentin in Crohn disease. *Autophagy* **2012**, *8*, 1695–1696. [[CrossRef](#)]
117. Stevens, C.; Henderson, P.; Nimmo, E.R.; Soares, D.C.; Dogan, B.; Simpson, K.W.; Barrett, J.C.; International Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium; Wilson, D.C.; Satsangi, J. The intermediate filament protein, vimentin, is a regulator of NOD2 activity. *Gut* **2013**, *62*, 695–707. [[CrossRef](#)]
118. Vazeille, E.; Buisson, A.; Bringer, M.-A.; Goutte, M.; Ouchchane, L.; Hugot, J.-P.; de Vallée, A.; Barnich, N.; Bommelaer, G.; Darfeuille-Michaud, A. Monocyte-derived macrophages from Crohn's disease patients are impaired in the ability to control intracellular adherent-invasive *Escherichia coli* and exhibit disordered cytokine secretion profile. *J. Crohns Colitis* **2015**, *9*, 410–420. [[CrossRef](#)]
119. Elliott, T.R.; Hudspith, B.N.; Rayment, N.B.; Prescott, N.J.; Petrovska, L.; Hermon-Taylor, J.; Brostoff, J.; Boussioutas, A.; Mathew, C.G.; Sanderson, J.D. Defective macrophage handling of *Escherichia coli* in Crohn's disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2015**, *30*, 1265–1274. [[CrossRef](#)]
120. 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: Autophagy controls AIEC replication within macrophages. *Cell. Microbiol.* **2012**, *14*, 791–807. [[CrossRef](#)]
121. Buisson, A.; Douadi, C.; Ouchchane, L.; Goutte, M.; Hugot, J.-P.; Dubois, A.; Minet-Quinard, R.; Bouvier, D.; Bommelaer, G.; Vazeille, E.; et al. Macrophages Inability to Mediate Adherent-Invasive *E. coli* Replication is Linked to Autophagy in Crohn's Disease Patients. *Cells* **2019**, *8*, 1394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Fasseu, M.; Tréton, X.; Guichard, C.; Pedruzzi, E.; Cazals-Hatem, D.; Richard, C.; Aparicio, T.; Daniel, F.; Soulé, J.-C.; Moreau, R.; et al. Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *PLoS ONE* **2010**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Brest, P.; Lapaquette, P.; Souidi, M.; Lebrigand, K.; Cesaro, A.; Vouret-Craviari, V.; Mari, B.; Barbry, P.; Mosnier, J.-F.; Hébuterne, X.; et al. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 242–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Lu, C.; Chen, J.; Xu, H.-G.; Zhou, X.; He, Q.; Li, Y.-L.; Jiang, G.; Shan, Y.; Xue, B.; Zhao, R.-X.; et al. MIR106B and MIR93 prevent removal of bacteria from epithelial cells by disrupting ATG16L1-mediated autophagy. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 188–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Nguyen, H.T.T.; Dalmasso, G.; Müller, S.; Carrière, J.; Seibold, F.; Darfeuille-Michaud, A. Crohn's Disease-Associated Adherent Invasive *Escherichia coli* Modulate Levels of microRNAs in Intestinal Epithelial Cells to Reduce Autophagy. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 508–519. [[CrossRef](#)]
126. Larabi, A.; Dalmasso, G.; Delmas, J.; Barnich, N.; Nguyen, H.T.T. Exosomes transfer miRNAs from cell-to-cell to inhibit autophagy during infection with Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli*. *Gut Microbes* **2020**, accepted.
127. Flotho, A.; Melchior, F. Sumoylation: A regulatory protein modification in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2013**, *82*, 357–385. [[CrossRef](#)]
128. Fritah, S.; Lhocine, N.; Golebiowski, F.; Mounier, J.; Andrieux, A.; Jouvion, G.; Hay, R.T.; Sansonetti, P.; Dejean, A. Sumoylation controls host anti-bacterial response to the gut invasive pathogen *Shigella flexneri*. *EMBO Rep.* **2014**, *15*, 965–972. [[CrossRef](#)]
129. Sidik, S.M.; Salsman, J.; Dellaire, G.; Rohde, J.R. *Shigella* Infection Interferes with SUMOylation and Increases PML-NB Number. *PLoS ONE* **2015**, *10*. [[CrossRef](#)]
130. Ribet, D.; Hamon, M.; Gouin, E.; Nahori, M.-A.; Impens, F.; Neyret-Kahn, H.; Gevaert, K.; Vandekerckhove, J.; Dejean, A.; Cossart, P. *Listeria monocytogenes* impairs SUMOylation for efficient infection. *Nature* **2010**, *464*, 1192–1195. [[CrossRef](#)]
131. Dalmasso, G.; Nguyen, H.T.T.; Faïs, T.; Massier, S.; Barnich, N.; Delmas, J.; Bonnet, R. Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Manipulate Host Autophagy by Impairing SUMOylation. *Cells* **2019**, *8*, 35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Delmas, J.; Gibold, L.; Faïs, T.; Batista, S.; Lereboure, M.; Sinel, C.; Vazeille, E.; Cattoir, V.; Buisson, A.; Barnich, N.; et al. Metabolic adaptation of adherent-invasive *Escherichia coli* to exposure to bile salts. *Sci. Rep.* **2019**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



133. Ormsby, M.J.; Logan, M.; Johnson, S.A.; McIntosh, A.; Fallata, G.; Papadopoulou, R.; Papachristou, E.; Hold, G.L.; Hansen, R.; Ijaz, U.Z.; et al. Inflammation associated ethanolamine facilitates infection by Crohn's disease-linked adherent-invasive Escherichia coli. *EBioMedicine* **2019**, *43*, 325–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Duboc, H.; Rajca, S.; Rainteau, D.; Benarous, D.; Maubert, M.-A.; Quervain, E.; Thomas, G.; Barbu, V.; Humbert, L.; Despras, G.; et al. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut* **2013**, *62*, 531–539. [[CrossRef](#)]
135. Tedelind, S.; Westberg, F.; Kjerrulf, M.; Vidal, A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 2826–2832. [[CrossRef](#)]
136. Tan, J.; McKenzie, C.; Potamitis, M.; Thorburn, A.N.; Mackay, C.R.; Macia, L. The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv. Immunol.* **2014**, *121*, 91–119. [[CrossRef](#)]
137. Hung, C.-C.; Garner, C.D.; Slauch, J.M.; Dwyer, Z.W.; Lawhon, S.D.; Frye, J.G.; McClelland, M.; Ahmer, B.M.M.; Altier, C. The Intestinal Fatty Acid Propionate Inhibits Salmonella Invasion through the Post-translational Control of HilD. *Mol. Microbiol.* **2013**, *87*, 1045–1060. [[CrossRef](#)]
138. González-Fandos, E.; Maya, N.; Pérez-Arnedo, I. Effect of propionic acid on Campylobacter jejuni attached to chicken skin during refrigerated storage. *Int. Microbiol.* **2015**, *18*, 171–175. [[CrossRef](#)]
139. Ormsby, M.J.; Johnson, S.A.; Carpena, N.; Meikle, L.M.; Goldstone, R.J.; McIntosh, A.; Wessel, H.M.; Hulme, H.E.; McConnachie, C.C.; Connolly, J.P.R.; et al. Propionic Acid Promotes the Virulent Phenotype of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 2297–2305.e5. [[CrossRef](#)]
140. Agus, A.; Denizot, J.; Thévenot, J.; Martinez-Medina, M.; Massier, S.; Sauvanet, P.; Bernalier-Donadille, A.; Denis, S.; Hofman, P.; Bonnet, R.; et al. Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive E. coli infection and intestinal inflammation. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19032. [[CrossRef](#)]
141. Kitamoto, S.; Alteri, C.J.; Rodrigues, M.; Nagao-Kitamoto, H.; Sugihara, K.; Himpfl, S.D.; Bazzi, M.; Miyoshi, M.; Nishioka, T.; Hayashi, A.; et al. Dietary l-serine confers a competitive fitness advantage to Enterobacteriaceae in the inflamed gut. *Nat. Microbiol.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Chassaing, B.; Koren, O.; Goodrich, J.K.; Poole, A.C.; Srinivasan, S.; Ley, R.E.; Gewirtz, A.T. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* **2015**, *519*, 92–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Chassaing, B.; Van de Wiele, T.; De Bodt, J.; Marzorati, M.; Gewirtz, A.T. Dietary emulsifiers directly alter human microbiota composition and gene expression ex vivo potentiating intestinal inflammation. *Gut* **2017**, *66*, 1414–1427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Small, C.L.; Xing, L.; McPhee, J.B.; Law, H.T.; Coombes, B.K. Acute Infectious Gastroenteritis Potentiates a Crohn's Disease Pathobiont to Fuel Ongoing Inflammation in the Post-Infectious Period. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Vijay-Kumar, M.; Sanders, C.J.; Taylor, R.T.; Kumar, A.; Aitken, J.D.; Sitaraman, S.V.; Neish, A.S.; Uematsu, S.; Akira, S.; Williams, I.R.; et al. Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 3909–3921. [[CrossRef](#)]
146. Carvalho, F.A.; Koren, O.; Goodrich, J.K.; Johansson, M.E.V.; Nalbantoglu, I.; Aitken, J.D.; Su, Y.; Chassaing, B.; Walters, W.A.; González, A.; et al. Transient inability to manage proteobacteria promotes chronic gut inflammation in TLR5-deficient mice. *Cell Host Microbe* **2012**, *12*, 139–152. [[CrossRef](#)]
147. Wymore Brand, M.; Wannemuehler, M.J.; Phillips, G.J.; Proctor, A.; Overstreet, A.-M.; Jergens, A.E.; Orcutt, R.P.; Fox, J.G. The Altered Schaedler Flora: Continued Applications of a Defined Murine Microbial Community. *ILAR J.* **2015**, *56*, 169–178. [[CrossRef](#)]
148. Chassaing, B.; Gewirtz, A.T. Mice harboring pathobiont-free microbiota do not develop intestinal inflammation that normally results from an innate immune deficiency. *PLoS ONE* **2018**, *13*. [[CrossRef](#)]
149. Bretin, A.; Lucas, C.; Larabi, A.; Dalmasso, G.; Billard, E.; Barnich, N.; Bonnet, R.; Nguyen, H.T.T. AIEC infection triggers modification of gut microbiota composition in genetically predisposed mice, contributing to intestinal inflammation. *Sci. Rep.* **2018**, *8*. [[CrossRef](#)]
150. Van den Abbeele, P.; Marzorati, M.; Derde, M.; De Weirtdt, R.; Joan, V.; Possemiers, S.; Van de Wiele, T. Arabinoxylans, inulin and Lactobacillus reuteri 1063 repress the adherent-invasive Escherichia coli from mucus in a mucosa-comprising gut model. *NPJ Biofilms Microbiomes* **2016**, *2*, 16016. [[CrossRef](#)]

151. Boudeau, J.; Glasser, A.-L.; Julien, S.; Colombel, J.-F.; Darfeuille-Michaud, A. Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2003**, *18*, 45–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Sivignon, A.; de Vallée, A.; Barnich, N.; Denizot, J.; Darcha, C.; Pignède, G.; Vandekerckove, P.; Darfeuille-Michaud, A. *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 Prevents Colitis Induced by AIEC Bacteria in the Transgenic Mouse Model Mimicking Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2015**, *21*, 276–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Brument, S.; Sivignon, A.; Dumych, T.I.; Moreau, N.; Roos, G.; Guérardel, Y.; Chalopin, T.; Deniaud, D.; Bilyy, R.O.; Darfeuille-Michaud, A.; et al. Thiazolylaminomannosides As Potent Antiadhesives of Type 1 Piliated *Escherichia coli* Isolated from Crohn's Disease Patients. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5395–5406. [[CrossRef](#)]
154. Yan, X.; Sivignon, A.; Yamakawa, N.; Crepet, A.; Travelet, C.; Borsali, R.; Dumych, T.; Li, Z.; Bilyy, R.; Deniaud, D.; et al. Glycopolymers as Antiadhesives of *E. coli* Strains Inducing Inflammatory Bowel Diseases. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 1827–1836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Chalopin, T.; Alvarez Dorta, D.; Sivignon, A.; Caudan, M.; Dumych, T.I.; Bilyy, R.O.; Deniaud, D.; Barnich, N.; Bouckaert, J.; Gouin, S.G. Second generation of thiazolylmannosides, FimH antagonists for *E. coli*-induced Crohn's disease. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 3913–3925. [[CrossRef](#)]
156. Sivignon, A.; Yan, X.; Alvarez Dorta, D.; Bonnet, R.; Bouckaert, J.; Fleury, E.; Bernard, J.; Gouin, S.G.; Darfeuille-Michaud, A.; Barnich, N. Development of Heptylmannoside-Based Glycoconjugate Antiadhesive Compounds against Adherent-Invasive *Escherichia coli* Bacteria Associated with Crohn's Disease. *mBio* **2015**, *6*. [[CrossRef](#)]
157. Alvarez Dorta, D.; Sivignon, A.; Chalopin, T.; Dumych, T.I.; Roos, G.; Bilyy, R.O.; Deniaud, D.; Krammer, E.-M.; de Ruycck, J.; Lensink, M.F.; et al. The Antiadhesive Strategy in Crohn's Disease: Orally Active Mannosides to Decolonize Pathogenic *Escherichia coli* from the Gut. *ChemBioChem* **2016**, *17*, 936–952. [[CrossRef](#)]
158. Cauwel, M.; Sivignon, A.; Bridot, C.; Nongbe, M.C.; Deniaud, D.; Roubinet, B.; Landemarre, L.; Felpin, F.-X.; Bouckaert, J.; Barnich, N.; et al. Heptylmannose-functionalized cellulose for the binding and specific detection of pathogenic *E. coli*. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 10158–10161. [[CrossRef](#)]
159. Vazeille, E.; Bringer, M.-A.; Gardarin, A.; Chambon, C.; Becker-Pauly, C.; Pender, S.L.F.; Jakob, C.; Müller, S.; Lottaz, D.; Darfeuille-Michaud, A. Role of mepirins to protect ileal mucosa of Crohn's disease patients from colonization by adherent-invasive *E. coli*. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21199. [[CrossRef](#)]
160. Nold-Petry, C.A.; Nold, M.F.; Levy, O.; Kliger, Y.; Oren, A.; Borukhov, I.; Becker, C.; Wirtz, S.; Sandhu, M.K.; Neurath, M.; et al. Gp96 Peptide Antagonist gp96-II Confers Therapeutic Effects in Murine Intestinal Inflammation. *Front. Immunol.* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)]
161. Png, C.W.; Lindén, S.K.; Gilshenan, K.S.; Zoetendal, E.G.; McSweeney, C.S.; Sly, L.I.; McGuckin, M.A.; Florin, T.H.J. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am. J. Gastroenterol.* **2010**, *105*, 2420–2428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Kerman, D.H.; Deshpande, A.R. Gut microbiota and inflammatory bowel disease: The role of antibiotics in disease management. *Postgrad. Med.* **2014**, *126*, 7–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Nitzan, O.; Elias, M.; Peretz, A.; Saliba, W. Role of antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 1078–1087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Dogan, B.; Fu, J.; Zhang, S.; Scherl, E.J.; Simpson, K.W. Rifaximin decreases virulence of Crohn's disease-associated *Escherichia coli* and epithelial inflammatory responses. *J. Antibiot.* **2018**, *71*, 485–494. [[CrossRef](#)]
165. Kleanthous, C.; Hemmings, A.M.; Moore, G.R.; James, R. Immunity proteins and their specificity for endonuclease colicins: Telling right from wrong in protein-protein recognition. *Mol. Microbiol.* **1998**, *28*, 227–233. [[CrossRef](#)]
166. Riley, M.A.; Wertz, J.E. Bacteriocin diversity: Ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* **2002**, *84*, 357–364. [[CrossRef](#)]
167. Cascales, E.; Buchanan, S.K.; Duché, D.; Kleanthous, C.; Lloubès, R.; Postle, K.; Riley, M.; Slatin, S.; Cavard, D. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, *71*, 158–229. [[CrossRef](#)]
168. Brown, C.L.; Smith, K.; Wall, D.M.; Walker, D. Activity of Species-specific Antibiotics Against Crohn's Disease-Associated Adherent-invasive *Escherichia coli*. *Inflamm. Bowel Dis.* **2015**, *21*, 2372–2382. [[CrossRef](#)]

169. Kotłowski, R. Use of *Escherichia coli* Nissle 1917 producing recombinant colicins for treatment of IBD patients. *Med Hypotheses* **2016**, *93*, 8–10. [[CrossRef](#)]
170. Reyes, A.; Haynes, M.; Hanson, N.; Angly, F.E.; Heath, A.C.; Rohwer, F.; Gordon, J.I. Viruses in the fecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* **2010**, *466*, 334–338. [[CrossRef](#)]
171. Hoyles, L.; McCartney, A.L.; Neve, H.; Gibson, G.R.; Sanderson, J.D.; Heller, K.J.; van Sinderen, D. Characterization of virus-like particles associated with the human faecal and caecal microbiota. *Res. Microbiol.* **2014**, *165*, 803–812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Sarker, S.A.; Sultana, S.; Reuteler, G.; Moine, D.; Descombes, P.; Charton, F.; Bourdin, G.; McCallin, S.; Ngom-Bru, C.; Neville, T.; et al. Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea With Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children From Bangladesh. *EBioMedicine* **2016**, *4*, 124–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Galtier, M.; De Sordi, L.; Maura, D.; Arachchi, H.; Volant, S.; Dillies, M.-A.; Debarbieux, L. Bacteriophages to reduce gut carriage of antibiotic resistant uropathogens with low impact on microbiota composition. *Environ. Microbiol.* **2016**, *18*, 2237–2245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Galtier, M.; De Sordi, L.; Sivignon, A.; de Vallée, A.; Maura, D.; Neut, C.; Rahmouni, O.; Wannerberger, K.; Darfeuille-Michaud, A.; Desreumaux, P.; et al. Bacteriophages targeting adherent invasive *Escherichia coli* strains as a promising new treatment for Crohn's disease. *J. Crohns Colitis* **2017**, *11*, 840–847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Stolp, H.; Starr, M.P. *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et sp. n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism. *Antonie Leeuwenhoek* **1963**, *29*, 217–248. [[CrossRef](#)]
176. Iebba, V.; Santangelo, F.; Totino, V.; Nicoletti, M.; Gagliardi, A.; De Biase, R.V.; Cucchiara, S.; Nencioni, L.; Conte, M.P.; Schippa, S. Higher prevalence and abundance of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the human gut of healthy subjects. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61608. [[CrossRef](#)]
177. Rendulic, S.; Jagtap, P.; Rosinus, A.; Eppinger, M.; Baar, C.; Lanz, C.; Keller, H.; Lambert, C.; Evans, K.J.; Goesmann, A.; et al. A predator unmasked: Life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science* **2004**, *303*, 689–692. [[CrossRef](#)]
178. Lambert, C.; Morehouse, K.A.; Chang, C.-Y.; Sockett, R.E. *Bdellovibrio*: Growth and development during the predatory cycle. *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, *9*, 639–644. [[CrossRef](#)]
179. Bonfiglio, G.; Neroni, B.; Radocchia, G.; Pompilio, A.; Mura, F.; Trancassini, M.; Di Bonaventura, G.; Pantanella, F.; Schippa, S. Growth Control of Adherent-Invasive *Escherichia coli* (AIEC) by the Predator Bacteria *Bdellovibrio bacteriovorus*: A New Therapeutic Approach for Crohn's Disease Patients. *Microorganisms* **2019**, *8*, 17. [[CrossRef](#)]
180. Cianfanelli, F.R.; Monlezun, L.; Coulthurst, S.J. Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. *Trends Microbiol.* **2016**, *24*, 51–62. [[CrossRef](#)]
181. Chassaing, B.; Cascales, E. Antibacterial Weapons: Targeted Destruction in the Microbiota. *Trends Microbiol.* **2018**, *26*, 329–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Sana, T.G.; Flaugnatti, N.; Lugo, K.A.; Lam, L.H.; Jacobson, A.; Baylot, V.; Durand, E.; Journet, L.; Cascales, E.; Monack, D.M. *Salmonella Typhimurium* utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E5044–E5051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Chatzidaki-Livanis, M.; Geva-Zatorsky, N.; Comstock, L.E. *Bacteroides fragilis* type VI secretion systems use novel effector and immunity proteins to antagonize human gut Bacteroidales species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 3627–3632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Hecht, A.L.; Casterline, B.W.; Earley, Z.M.; Goo, Y.A.; Goodlett, D.R.; Bubeck Wardenburg, J. Strain competition restricts colonization of an enteric pathogen and prevents colitis. *EMBO Rep.* **2016**, *17*, 1281–1291. [[CrossRef](#)]
185. Anderson, M.C.; Vonaesch, P.; Saffarian, A.; Marteyn, B.S.; Sansonetti, P.J. *Shigella sonnei* Encodes a Functional T6SS Used for Interbacterial Competition and Niche Occupancy. *Cell Host Microbe* **2017**, *21*, 769–776. [[CrossRef](#)]
186. Wettstadt, S.; Filloux, A. Manipulating the type VI secretion system spike to shuttle passenger proteins. *PLoS ONE* **2020**, *15*. [[CrossRef](#)]
187. Hamilton, T.A.; Pellegrino, G.M.; Therrien, J.A.; Ham, D.T.; Bartlett, P.C.; Karas, B.J.; Gloor, G.B.; Edgell, D.R. Efficient inter-species conjugative transfer of a CRISPR nuclease for targeted bacterial killing. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4544. [[CrossRef](#)]

188. Rodrigues, M.; McBride, S.W.; Hullahalli, K.; Palmer, K.L.; Duerkop, B.A. Conjugative Delivery of CRISPR-Cas9 for the Selective Depletion of Antibiotic-Resistant Enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*. [[CrossRef](#)]
189. Hooper, K.M.; Casanova, V.; Kemp, S.; Staines, K.A.; Satsangi, J.; Barlow, P.G.; Henderson, P.; Stevens, C. The Inflammatory Bowel Disease Drug Azathioprine Induces Autophagy via mTORC1 and the Unfolded Protein Response Sensor PERK. *Inflamm. Bowel Dis.* **2019**, *25*, 1481–1496. [[CrossRef](#)]
190. Al Azzaz, J.; Rieu, A.; Aires, V.; Delmas, D.; Chluba, J.; Winckler, P.; Bringer, M.-A.; Lamarche, J.; Vervandier-Fasseur, D.; Dalle, F.; et al. Resveratrol-Induced Xenophagy Promotes Intracellular Bacteria Clearance in Intestinal Epithelial Cells and Macrophages. *Front. Immunol.* **2019**, *9*. [[CrossRef](#)]
191. Nickerson, K.P.; McDonald, C. Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli Adhesion Is Enhanced by Exposure to the Ubiquitous Dietary Polysaccharide Maltodextrin. *PLoS ONE* **2012**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
192. Tran, H.Q.; Ley, R.E.; Gewirtz, A.T.; Chassaing, B. Flagellin-elicited adaptive immunity suppresses flagellated microbiota and vaccinates against chronic inflammatory diseases. *Nat. Commun.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Viladomiu, M.; Kivolowitz, C.; Abdulhamid, A.; Dogan, B.; Victorio, D.; Castellanos, J.G.; Woo, V.; Teng, F.; Tran, N.L.; Sczesnak, A.; et al. IgA-coated *E. coli* enriched in Crohn's disease spondyloarthritis promote T<sub>H</sub> 17-dependent inflammation. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, eaaf9655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



# Travail expérimental

## Objectifs du travail de recherche

---

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) qui se caractérise par une inflammation chronique du système digestif. Cette maladie, incurable à ce jour, évolue par poussées inflammatoires entrecoupées de période de rémission clinique (Roda *et al.*, 2020; Torres *et al.*, 2017). L'étiologie de la MC est complexe impliquant des prédispositions génétiques, des facteurs environnementaux ainsi que des altérations du microbiote intestinal. Notamment, les bactéries pathobiontes *Escherichia coli* adhérentes et invasives (AIEC) sont particulièrement trouvées au niveau de la muqueuse iléale des patients atteints de MC comparativement à des sujets contrôles (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998, 2004; Palmela *et al.*, 2018). Cependant, les mécanismes menant à cette colonisation anormale n'ont pour le moment pas été totalement caractérisés. Depuis quelques années, l'implication des facteurs épigénétiques dans la pathogenèse de la MC est étudiée. Des altérations épigénétiques ont notamment été observées chez les patients, telles que des modifications des niveaux d'acétylation des histones ou une diminution de l'expression des HDACs (Friedrich *et al.*, 2019; Tsaprouni *et al.*, 2011).

L'ensemble des travaux réalisés au cours de ma thèse a eu pour objectif principal de mieux comprendre l'interaction entre les bactéries AIEC et l'épithélium intestinal. Pour répondre à cet objectif, mon travail de recherche s'est articulé autour de 2 axes principaux : i) identifier les facteurs épigénétiques et environnementaux contrôlant l'implantation des bactéries AIEC chez les patients, et ii) développer un nouveau modèle murin pour l'étude de l'interaction AIEC-épithélium intestinal.

- **Identification d'acteurs épigénétiques impliqués dans le contrôle de l'infection des cellules épithéliales intestinales par les AIEC.** Ce premier axe a été structuré en 3 parties :

- *Étude du rôle des HDACs dans le mécanisme d'infection des cellules épithéliales intestinales par les bactéries AIEC.*

Pour cela, l'activité et l'expression des HDACs ont été inhibées *in vitro* et dans le modèle murin CEABAC10, permettant d'identifier HDAC1 et HDAC5 comme des acteurs centraux et antagonistes de la régulation de l'entrée des AIEC au sein des CEIs. Aussi, à partir d'une large cohorte de patients atteints de MC, il a pu être démontré que l'expression de HDAC1 et HDAC5 corrélait avec la quantité d'Entérobactéries associées à la muqueuse iléale de patients et qu'il y avait une dérégulation de l'expression de ces deux HDACs chez les patients porteurs de bactéries AIEC. L'effet d'un régime alimentaire enrichi en graisses (HF) a également été étudié afin de déterminer s'il pouvait être à l'origine du déséquilibre de l'expression des HDACs observé chez les patients. Les résultats ont révélé que le régime HF créerait un microenvironnement spécifique dans l'intestin favorisant l'accès des AIEC aux CEIs, où elles peuvent moduler l'épigénome de l'hôte à leur avantage afin de coloniser. Ces travaux



seront présentés sous forme d'article scientifique, récemment publié dans le journal « Gut Microbes » (Chervy *et al.*, 2022).

- *Identification des mécanismes moléculaires sous-jacents de la régulation HDAC-dépendante de la colonisation intestinale par les AIEC.*

Le but de ce travail de recherche était de mieux comprendre comment HDAC1 et HDAC5 contrôlaient la colonisation intestinale par les AIEC. Pour cela, nous avons identifié les gènes et les voies cellulaires régulés par ces HDACs grâce à une analyse transcriptomique des cellules Caco-2 transfectées avec des siARNs dirigés contre HDAC1 et HDAC5. Cela a permis de mettre en évidence que HDAC1 régulait l'expression de gènes impliqués dans la formation du cytosquelette d'actine, mais également les voies de signalisation associées à la synthèse de cytokines, tandis que HDAC5 était impliqué dans la régulation de l'organisation des jonctions cellulaires. De manière plus spécifique, *GCNT1* a été identifié comme un gène cible de HDAC1 et HDAC5 impliqué dans la régulation de la colonisation intestinale par les Entérobactéries. Enfin, l'analyse du transcriptome a également été réalisée sur des cellules transfectées avec les siARNs et infectées avec la souche AIEC LF82, révélant notamment que HDAC1 tempérait la réponse inflammatoire induite par l'infection. Ces résultats seront présentés ici sous forme de résultats complémentaires, ils feront l'objet d'une publication après une validation fonctionnelle des phénotypes observés.

- *Effets du régime occidental sur les marques épigénétiques et l'expression des gènes au niveau iléal.*

L'activité HDAC a été étudiée dans des cellules épithéliales intestinales d'iléon de souris, révélant que la consommation d'un régime HF enrichi en graisses diminuait l'activité enzymatique globale au niveau iléal. Afin d'étudier l'effet du régime sur l'expression des gènes, une analyse transcriptomique a été réalisée sur des échantillons d'iléon de ces souris sous régime HF. Nous avons constaté que le régime induisait une diminution de l'expression de HDAC5 et du ratio HDAC1/HDAC5, conditions favorisant la colonisation intestinale par les AIEC, et qu'il réprimait aussi l'expression de gènes impliqués dans la reconnaissance et la prise en charge des bactéries. En étudiant les mêmes gènes en condition d'infection, nous avons observé un effet similaire entre infection et régime HF, sans effet cumulatif, l'effet du régime semblant plus important. Il apparaît ainsi que le régime HF créerait un microenvironnement spécifique au niveau de l'iléon, qui serait favorable à l'implantation des bactéries pathobiontes AIEC au niveau de la muqueuse. Ces résultats seront présentés ici sous forme de résultats complémentaires, ils feront l'objet d'une publication après une validation fonctionnelle des phénotypes observés.

**- Mise au point d'un nouveau modèle murin pour l'étude de l'interaction AIEC-épithélium intestinal.**

Au cours de ce travail, le modèle murin transgénique « Vill-*hCC6* » a été généré et caractérisé. Dans ce modèle, l'expression du gène humain *CEACAM6* est contrôlée par le promoteur du gène murin *Villin*, permettant de reproduire la surexpression anormale de *CEACAM6* au niveau de l'intestin grêle des animaux. Il a été démontré *ex vivo* que la surexpression de *CEACAM6* par les entérocytes de l'intestin grêle corrélait avec un haut niveau de glycosylation de la muqueuse intestinale, favorisant l'adhésion des bactéries AIEC. *In vivo*, les bactéries AIEC persistaient davantage, d'une manière FimH-dépendante, dans la muqueuse iléale des souris transgéniques comparativement aux souris sauvages, validant ce nouveau modèle qui pourra désormais être utilisé comme modèle d'étude de l'infection par les AIEC *in vivo*. Ce travail sera présenté ici sous forme d'article scientifique, récemment publié dans le journal « Disease Models & Mechanisms » (Sivignon *et al.*, 2022).

## Introduction de la publication n°1

---

Un des principaux facteurs environnementaux mis en cause dans la pathogenèse de la MC est le régime alimentaire, et plus précisément la consommation d'un régime alimentaire dit « occidentalisé ». Ce type de régime, enrichi en sucres, en graisses, en aliments transformés et pauvres en fibres est associé à un risque accru de développer la MC (Chiba *et al.*, 2019; Gill *et al.*, 2022; Lo *et al.*, 2020; Narula *et al.*, 2021). De plus, les patients atteints de la MC présentent une dysbiose caractérisée par une diminution de l'abondance et des modifications de la diversité microbienne, avec notamment une expansion des Protéobactéries (Alam *et al.*, 2020; Frank *et al.*, 2007; Gevers *et al.*, 2014; Manichanh *et al.*, 2006; Pascal *et al.*, 2017; Walker *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2015). De manière plus spécifique, un pathotype particulier d'*Escherichia coli*, les *Escherichia coli* adhérents et invasifs (AIEC), colonise anormalement la muqueuse iléale des patients, la prévalence des AIEC variant de 21 à 62% chez les patients atteints de MC contre 0 à 19% chez les contrôles (Baumgart *et al.*, 2007; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Martinez-Medina *et al.*, 2009; Nadalian *et al.*, 2021; Palmela *et al.*, 2018; Raso *et al.*, 2011). Il a été démontré, dans des modèles murins de susceptibilité, que l'infection par ces bactéries pathobiontes induisait la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et augmentait la perméabilité intestinale, suggérant que ces bactéries participeraient au déclenchement et/ou au maintien de la MC (Carvalho *et al.*, 2009; Denizot *et al.*, 2012). Enfin, il a été révélé que le régime de type occidental augmentait fortement la capacité des bactéries AIEC à coloniser la muqueuse intestinale *in vivo* (Agus *et al.*, 2016; Martinez-Medina *et al.*, 2014).

Depuis quelques années, une attention nouvelle est portée sur les facteurs épigénétiques et leurs rôles dans la pathogenèse de la MC. La plupart des études se sont intéressées aux modifications des profils de méthylation de l'ADN dans le contexte de la MC (Hornsuh *et al.*, 2021; Howell *et al.*, 2018; Moret-Tatay *et al.*, 2019; Serena *et al.*, 2020; Somineni *et al.*, 2019; Ventham *et al.*, 2016). Cependant, peu de travaux se sont concentrés sur les modifications post-traductionnelles des histones (Hornsuh *et al.*, 2021). Comme décrit dans l'introduction bibliographique, il a été montré dans des modèles *in vivo* d'inflammation intestinale que l'histone H4 était significativement plus acétylée dans les tissus enflammés des animaux présentant une colite comparativement aux animaux contrôles. Le niveau d'acétylation global de H4 était également plus élevé dans des biopsies enflammées et au niveau des plaques de Peyer issues de patients atteints de MC comparativement à des tissus contrôles d'individus sains et des tissus non enflammés issus de patients souffrant de MC, ce qui suggère une association entre l'acétylation des histones et l'inflammation intestinale dans la MC (Tsaprouni *et al.*, 2011). Concernant les HDACs, une diminution globale de l'expression de 8 HDACs a été observée dans des cellules épithéliales intestinales (CEIs) isolées de biopsies coliques de patients en situation de poussées inflammatoires comparativement à des sujets sains, ce qui pourrait potentiellement expliquer

l'augmentation du niveau d'acétylation des histones observée par Tsaprouni et collaborateurs (Friedrich *et al.*, 2019).

À ce jour, les mécanismes conduisant à la colonisation anormale de la muqueuse iléale par les Entérobactéries et plus spécifiquement par les bactéries pathobiontes AIEC chez les patients atteints de MC n'ont pas été entièrement caractérisés. Ainsi, les objectifs principaux de cette étude ont été : (1) d'étudier l'acétylation des histones chez les patients atteints de MC et porteurs d'AIEC, (2) de déterminer le rôle des HDACs dans la colonisation des CEIs par les AIEC dans des modèles *in vitro* et *in vivo* et de valider les données dans une cohorte de patients, et (3) d'étudier l'implication du régime alimentaire de type occidental dans la régulation de l'acétylation des histones et des HDACs *in vivo*.



## Epigenetic master regulators HDAC1 and HDAC5 control pathobiont Enterobacteria colonization in ileal mucosa of Crohn's disease patients

Mélissa Chervy, Adeline Sivignon, Flavie Dambrine, Anthony Buisson, Pierre Sauvanet, Catherine Godfraind, Matthieu Allez, Lionel Le Bourhis, The Remind Group, Nicolas Barnich & Jérémy Denizot

To cite this article: Mélissa Chervy, Adeline Sivignon, Flavie Dambrine, Anthony Buisson, Pierre Sauvanet, Catherine Godfraind, Matthieu Allez, Lionel Le Bourhis, The Remind Group, Nicolas Barnich & Jérémy Denizot (2022) Epigenetic master regulators HDAC1 and HDAC5 control pathobiont Enterobacteria colonization in ileal mucosa of Crohn's disease patients, Gut Microbes, 14:1, 2127444, DOI: [10.1080/19490976.2022.2127444](https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2127444)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2127444>



© 2022 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.



View supplementary material [↗](#)



Published online: 29 Sep 2022.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

## Epigenetic master regulators HDAC1 and HDAC5 control pathobiont *Enterobacteria* colonization in ileal mucosa of Crohn's disease patients

Mélissa Chervy<sup>a</sup>, Adeline Sivignon<sup>a,b</sup>, Flavie Dambrine<sup>a</sup>, Anthony Buisson<sup>a,c</sup>, Pierre Sauvanet<sup>a,d</sup>, Catherine Godfraind<sup>a,e</sup>, Matthieu Allez<sup>f,g,h</sup>, Lionel Le Bourhis<sup>g</sup>, The Remind Group<sup>h</sup>, Nicolas Barnich<sup>a,b</sup>, and Jérémy Denizot<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Université Clermont Auvergne, Inserm U1071, USC-INRAE 2018, Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte (M2iSH), Clermont-Ferrand, France; <sup>b</sup>Institut Universitaire de Technologie, Génie Biologique, Aubière, France; <sup>c</sup>Gastroenterology Department, CHU Estaing, Clermont-Ferrand, France; <sup>d</sup>Surgery and Oncology Digestive Department, CHU Estaing, Clermont-Ferrand, France; <sup>e</sup>Neuropathology Unit, CHU Gabriel Montpied, Clermont-Ferrand, France; <sup>f</sup>Gastroenterology Department, Hôpital Saint-Louis - APHP, Paris, France; <sup>g</sup>Université De Paris, Institut de Recherche Saint-Louis, EMily, INSERM U1160, Paris, France; <sup>h</sup>Hôpital Saint-Louis, Paris, France

### ABSTRACT

Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC), which abnormally colonize the ileal mucosa of Crohn's disease (CD) patients, are known to contribute to the etiopathogenesis of CD. Molecular mechanisms favoring AIEC ileal colonization have not been completely characterized yet. The aim of this study was to investigate whether epigenetic regulators histone deacetylases (HDAC) expression in intestinal epithelial cells of CD patients regulate *Enterobacteria* and AIEC encroachment to intestinal mucosa. HDAC were inhibited *in vitro* and in CEABAC10 mice to decipher their involvement in the entry of AIEC within host cells. CD ileal samples from the REMIND cohort were used to study the relationship between HDAC expression level and *Enterobacteria*/AIEC colonization in patients. Mice were fed a westernized diet and orally challenged with AIEC to determine the impact of diet on HDAC expression. Global level of acetylated histone H3 is higher in patients colonized by AIEC bacteria compared to patients non-colonized by *Enterobacteria* and HDAC inhibition-mediated H3 hyperacetylation promotes the entry of AIEC bacteria within intestinal epithelial cells. HDAC1 and HDAC5 are central and antagonistic in the regulation of AIEC entry within host cells *in vitro*, in mouse models and in ileal mucosa of CD patients. In mice fed a western-type diet, AIEC infection decreases HDAC1 expression, inducing H3 hyperacetylation to favor their own colonization. CD patients under a western diet are more prone to be colonized by AIEC bacteria as such a diet affects intestinal homeostasis, enables AIEC access to intestinal mucosa where they then manipulate host epigenome to their advantage.

**Abbreviations:** AIEC Adherent-Invasive *Escherichia coli*; BSA Bovine serum albumin; CD Crohn's disease; CEABAC10 Carcinoembryonic antigen bacterial artificial chromosome 10; CEACAM Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule; FBS Fetal bovine serum; IBD Inflammatory Bowel Disease; HAT Histone acetyltransferase; HDAC Histone deacetylase; kDa KiloDalton; SAHA Suberoylanilide Hydroxamic Acid; Scr Scramble

### ARTICLE HISTORY

Received 16 June 2022  
Revised 26 August 2022  
Accepted 16 September 2022

### KEYWORDS



Histone deacetylases;  
Adherent-Invasive *E. coli*;  
Crohn's disease; histone  
acetylation; High-fat diet

## Introduction


Crohn's disease (CD) is an inflammatory bowel disease (IBD) characterized by chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal (GI) tract affecting preferentially the young adult. No curative treatment exists for this debilitating and life-long disease which evolves in a relapsing and remitting manner. Only symptomatic treatments are available to limit the frequency and intensity of the

inflammatory flares.<sup>1</sup> Different factors are involved in the development of the disease such as genetic susceptibilities, environmental factors, and microbiota composition.

The incidence of this disease severely increased over the last few decades, industrialized countries with westernized lifestyle (North America, Europe, Australia . . .) presenting higher incidences than in in-development countries.<sup>2</sup> One of the major

**CONTACT** Jérémy Denizot  [jeremy.denizot@uca.fr](mailto:jeremy.denizot@uca.fr)  M2iSH, UMR 1071 Inserm/Université Clermont Auvergne, CBRV, 28 place Henri Dunant, Clermont-Ferrand 63001, France

**REMIND Study Group Investigators:** Nassim Hammoudi, Philippe Seksik, Harry Sokol, Léon Maggiori, Carmen Stefanescu, Xavier Treton, Yoram Bouhnik, Michael Rodrigues, Anne Dubois, Pierre Desreumaux, Maria Nachury, Pauline Wils, Mathurin Fumery, Jean-Louis Dupas, Gilles Boschetti, Stéphane Nancey, Bernard Flourié, Xavier Hébuterne, Jérôme Filippi, Madeleine Bezault

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2127444>

© 2022 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



environmental factor involved in the etiology of CD is the type of diet, and more particularly the consumption of a “western diet” in industrialized countries. This diet, characterized by a high intake of fats, sugar and processed foods and a reduced quantity of fibers, is associated with a higher risk to develop CD.<sup>3–7</sup> Talking in regards with microbiota, most of patients present a dysbiosis with a reduction of the global microbial diversity, and an increase of the *Proteobacteria* phylum compared to healthy controls.<sup>8–10</sup> Enterobacteria, members of the *Proteobacteria* phylum can represent up to 100% of the aero-anaerobic microbiota associated with the ileal mucosa in CD and particular pathobiont invasive strains of *Escherichia coli*, designated as the pathotype adherent-invasive *E. coli* (AIEC), have been found in higher prevalence in CD patients compared to healthy controls (21–63% vs 0–19%).<sup>11–13</sup> These pathobiont bacteria can participate in the onset/maintenance of CD by inducing the secretion of pro-inflammatory cytokines and increasing intestinal permeability as demonstrated in genetically susceptible mouse model.<sup>14,15</sup> In CEABAC10 transgenic mice model mimicking CD, animals fed a high-fat diet (HF diet, enriched in fats) presented dysbiosis with an increase in *E. coli* population as well as increased intestinal permeability. Thus, this diet induced low-grade intestinal inflammation and promoted AIEC intestinal colonization.<sup>16,17</sup>

In addition, CD patients present Paneth cells abnormalities with a reduced expression of defensins.<sup>18–20</sup> In the work of Alkaissi et al.,<sup>21</sup> CD patients expressed less human  $\alpha$ -defensin 5 (HD5) and AIEC strain LF82 translocation was increased in follicle-associated epithelium (FAE) of CD patients compared to non-IBD controls. Tissue incubation with HD5 reduced AIEC LF82 bacterial passage, demonstrating that defensins are important to regulate AIEC gut colonization. However, considering that some AIEC strains are resistant to these host defense peptides, a better characterization of the molecular mechanisms promoting AIEC gut establishment in CD patients is required to develop specific therapeutic strategies.<sup>22</sup>

Recently, a renewed focus has been carried on the role of epigenetic marks in the pathogenesis of CD. Epigenetic modifications include DNA methylation and histones post-translational modifications

(HPTM) which control gene expression through the modulation of the structure of chromatin (formed by DNA and histones proteins) and accessibility of transcription factors to DNA. Most of researches investigated DNA methylation modifications in CD.<sup>23–28</sup> In contrast, only few studies focused on HPTM in the context of CD.<sup>29</sup> Among HPTM, histones acetylation, mediated by histones acetyltransferases (HAT/KAT), loosens chromatin structure favoring binding of transcription factors and hence gene expression, whereas deacetylation of histones compacts chromatin limiting gene expression. Histones deacetylases (HDAC) catalyze the removal of acetyl group from histones and non-histones proteins. In humans, 18 HDAC exist divided into two families based on their dependence on specific cofactors and the presence of a conserved deacetylase domain: the histone deacetylase (HDAC) family and the sirtuin family. The deacetylase family includes three classes: class I HDAC (HDAC1, 2, 3, 8), class II HDAC (subclass IIa: HDAC4, 5, 7, 9 and subclass IIb: HDAC6 and 10), and class IV HDAC (HDAC11).<sup>30,31</sup> HDAC, especially class I HDAC, are crucial in the regulation of intestinal epithelial cell differentiation, and intestinal homeostasis since HDAC1 and HDAC2 intestinal epithelial cells (IEC)-depleted mice present tissue architecture defects with Paneth cell loss, altered barrier function and chronic basal inflammation.<sup>32–35</sup> HDAC3<sup>ΔAIEC</sup> mice also develop Paneth cell loss as well as impaired IEC functions and dysbiosis.<sup>36</sup> Furthermore, in two animal models of intestinal inflammation, histone H4 was significantly more acetylated in the inflamed tissue of animals with colitis compared to controls animals.<sup>37</sup> Also, global acetylation level of histone H4 was significantly increased in inflamed biopsies and Peyer's patches from CD patients compared to non-inflamed CD patients and controls demonstrating an association between histone acetylation and intestinal inflammation in CD.<sup>37</sup> Concerning HDAC, a global decrease of the expression of 8 HDAC has been observed in human colonic epithelial cells of CD patients with active disease compared to controls.<sup>38</sup> These misregulations of HDAC expression could explain the increased acetylation level in histones observed by Tsaprouni *et al.*<sup>37</sup>

Mechanisms leading to an abnormal colonization of the ileal mucosa by Enterobacteria and more

specifically by *E. coli* pathobiont bacteria in CD patients have not been completely characterized yet. We hypothesize that in intestinal epithelial cells, there could be a deregulation of the activity or expression of HDAC. Since HDAC are responsible for the deacetylation of histone and non-histone proteins such as transcription factors, their alteration would lead to the misregulation of genes, and some of them might be involved in the control of the entry of AIEC bacteria within cells. Hence, the resulting abnormal genes expression following HDAC alterations could facilitate Enterobacteria and hence AIEC bacteria encroachment to intestinal mucosa. In this work, we show that patients colonized by AIEC bacteria present a higher level of acetylated histone H3 compared to patients non-colonized by AIEC bacteria. Using cellular and animal models, we reveal that HDAC1 expression is central to prevent AIEC colonization of intestinal mucosa and that, in contrast, HDAC5 expression favors AIEC encroachment. These results were confirmed in a large cohort of CD patients, in which we observed imbalanced HDAC1 and HDAC5 expression in AIEC-positive patients. Moreover, HDAC1 expression negatively correlated, whereas HDAC5 positively correlated, with Enterobacteria load associated with ileal mucosa in CD patients. We also observed that AIEC bacteria were able to modulate the host epigenome to their advantage in order to colonize the gut but only in mice fed a high fat diet, which present a specific gut micro-environment. Hence, our results identified HDAC1 and HDAC5 as crucial regulators of pathobiont Enterobacteria colonization of ileal mucosa in CD patients and revealed that targeting HDAC5 could represent an interesting therapeutic strategy to prevent AIEC colonization as well as a food rebalancing.

## Results

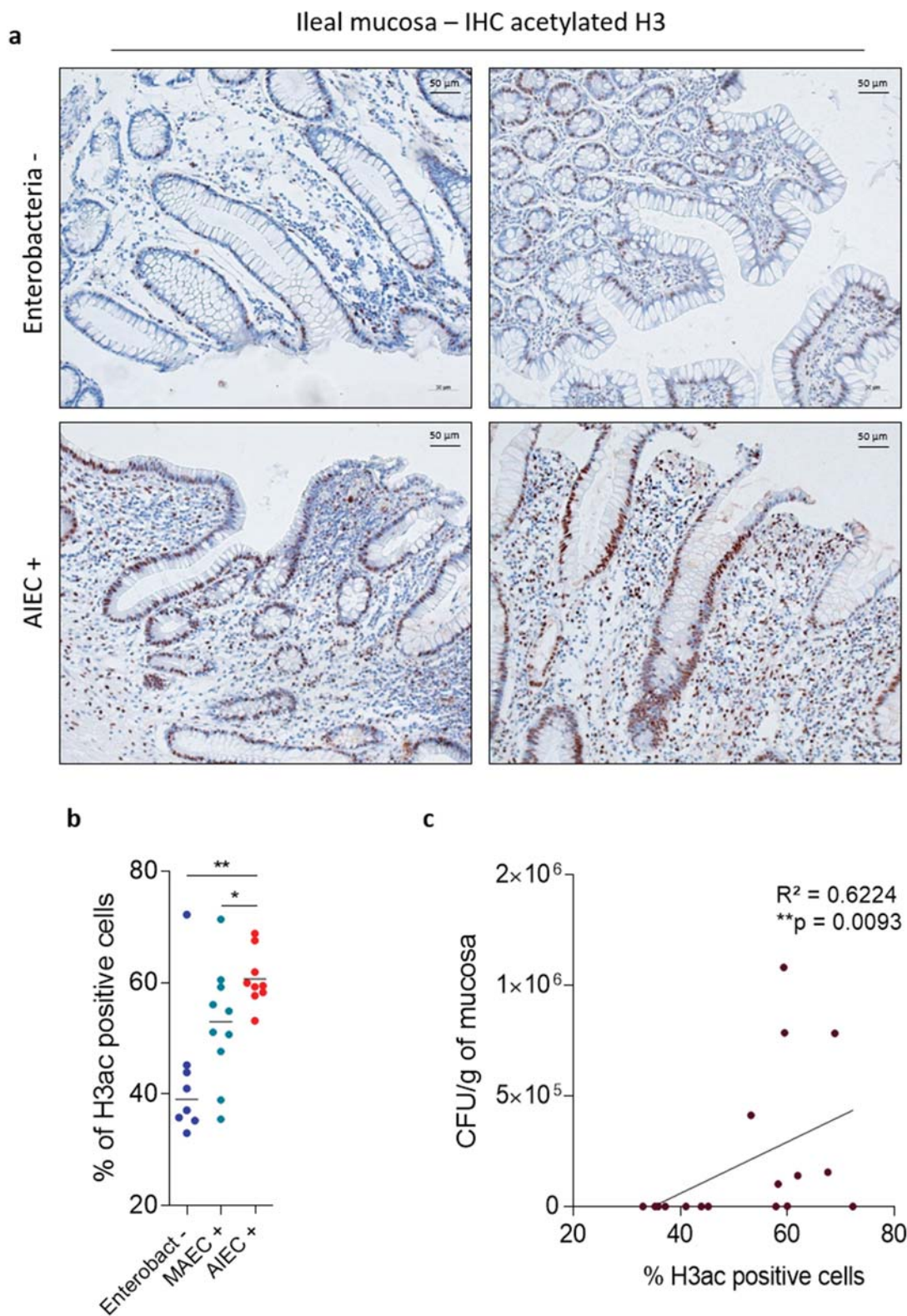
### ***AIEC bacteria are preferentially associated with hyperacetylated histone H3 intestinal epithelium***

The link existing between epigenetic modifications and pathobiont colonization remains unknown. In this context, we aimed to determine whether CD patients colonized by AIEC bacteria presented histone acetylation alterations in intestinal epithelial

cells. To this aim, the French multicentric REMIND cohort of CD ileal samples was used (**Table S1**). AIEC bacteria were identified by phenotypical characterization, and Enterobacteria load was quantified from ileal mucosa samples.<sup>39</sup> The global acetylation level of the histone H3 was studied by immunohistochemical staining using high dilution of primary antibody allowing only the detection of highly acetylated H3 nucleus. H3ac-positive and H3ac-negative epithelial cells were manually counted on mucosa samples from patients which were split into three groups: non-colonized by Enterobacteria (Enterobact -, n = 8), colonized by mucosa-associated *E. coli* (MAEC +, n = 10), and colonized by AIEC bacteria (AIEC +, n = 9). We observed that global H3 acetylation level was increased in MAEC + patients compared to patients non-colonized by Enterobacteria (median Enterobact -: 39.09% vs MAEC +: 53.02%). However, this increase did not reach significance. In contrast, we observed a significant increase of global H3 acetylation level in AIEC-carrier patients compared to patients non-colonized by Enterobacteria (median Enterobact -: 39.09% vs median AIEC +: 59.45%,  $p < .01$ ) and compared to patients colonized by MAEC bacteria (median MAEC +: 53.02% vs median AIEC +: 59.45%,  $p < .05$ ). Also, the percentage of H3ac-positive cells positively and significantly correlated with Enterobacteria load associated with the mucosa of patients (\*\* $p = .0093$ ), demonstrating that H3 hyperacetylation is associated with AIEC colonization in ileal mucosa of CD patients (**Figure 1 and Figure S1**).

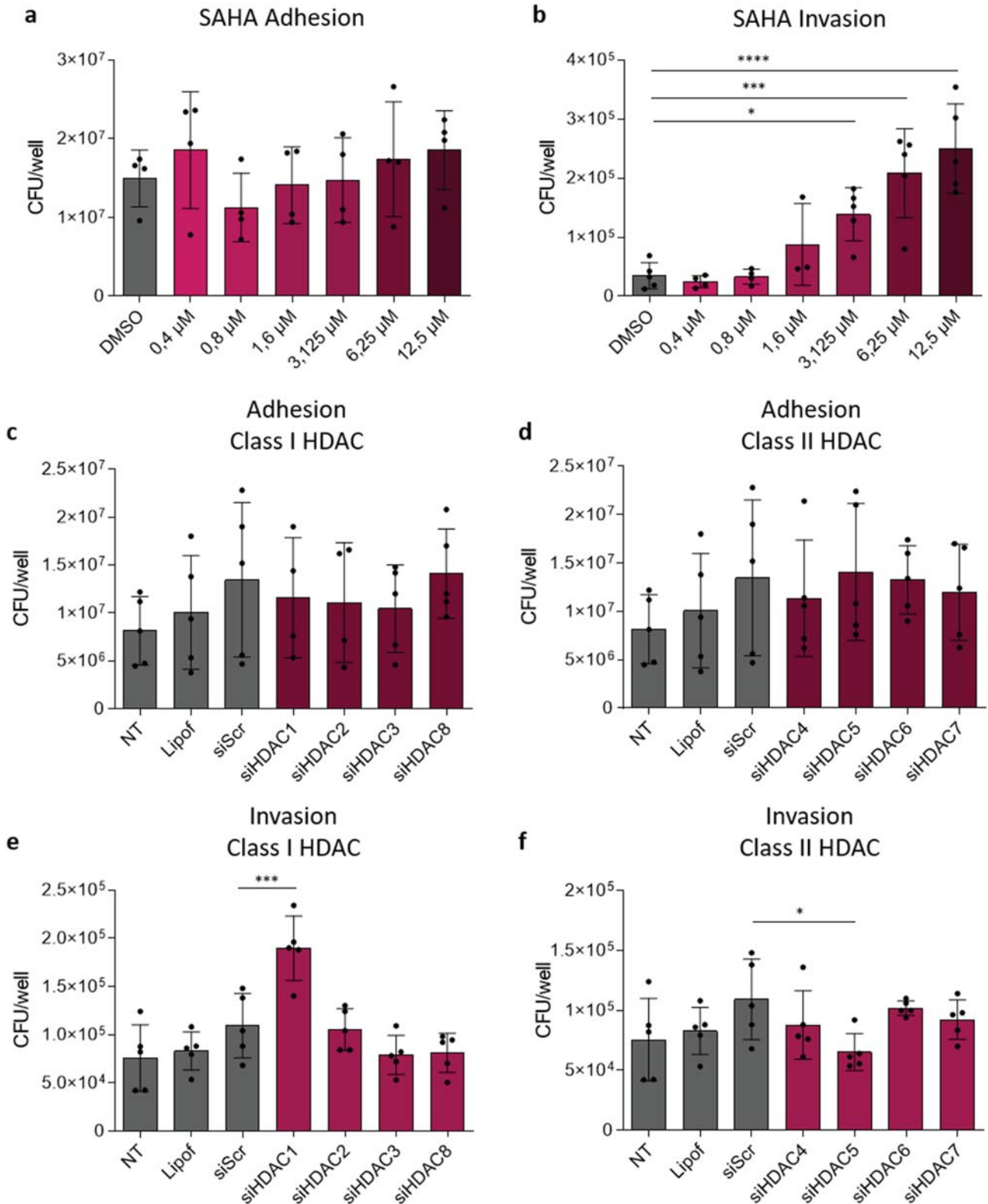
### ***HDAC inhibition favors the ability of AIEC bacteria to invade IECs in culture***

As H3 acetylation is mostly regulated by HDAC, we hypothesize that HDAC could be central in the control of AIEC colonization. In order to understand whether HDAC regulate the entry of AIEC bacteria within host cells, Caco-2 IECs were pre-treated with a global HDAC inhibitor (class I and II inhibitor), suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) at different concentrations before infection with the AIEC reference strain LF82. Efficacy and safety of the HDAC inhibitor were confirmed through



**Figure 1.** AIEC bacteria are preferentially associated with hyperacetylated histone H3 intestinal epithelium. **a:** Immunohistochemical staining of pan-H3 acetylation mark on mucosa samples from patients non-colonized by Enterobacteria (Enterobacteria -) and colonized by AIEC bacteria (AIEC +). **b:** Percentage of H3ac positive cells in samples of patients non-colonized by Enterobacteria (n = 8), colonized by mucosa-associated *E. coli* (MAEC +, n = 10) or colonized by AIEC bacteria (AIEC +, n = 9). Bars represent medians. Mann-Whitney test, \*p < .05, \*\*p < .01. **c:** Correlation between the percentage of H3ac positive cells and Enterobacteria load in patients non-colonized by Enterobacteria (n = 8) and colonized by AIEC bacteria (n = 9). Correlation existing between two variables was assessed by a Spearman test. H3ac: acetylated H3.





**Figure 2.** HDAC1 and HDAC5 oppositely control the entry of AIEC bacteria within host cell. **a-b:** Caco-2 cells were treated with increasing concentrations of HDAC inhibitor SAHA for 24 h before infection with the AIEC strain LF82 at MOI 100. Adhesive ability of AIEC strain LF82 was evaluated at 3 h post-infection (a) and a gentamicin protection assay was performed to evaluate invasive ability of the strain in the different conditions (b) ( $n = 4$ ). **c-f:** Caco-2 cells transfected with control siRNA (siScr) or siRNAs directed against the different HDAC were infected with AIEC strain LF82 at MOI 100. Adherent (c,d) and invasive (e,f) bacteria were numbered at 3 h and 4 h post-infection respectively ( $n = 5$ ). The results are the mean  $\pm$  SD. One-way ANOVA, \* $p < .05$ , \*\*\* $p < .001$ , \*\*\*\* $p < .0001$ . MOI: multiplicity of infection, Lipof: lipofectamine, NT: untreated, Scr: scramble.

the observation of a dose-dependent accumulation of H3K9ac mark by western blot and of a cell viability between 78.9% and 95.9%, respectively (**Figure S2A, B**). At 3 h post-infection, adherent bacteria were numbered and no significant differences between conditions were observed, demonstrating that HDAC are not involved in the AIEC adhesion process to IECs (**Figure 2a**). In contrast, a gentamicin protection assay revealed a significantly enhanced invasion ability of AIEC bacteria in SAHA-pretreated cells compared to DMSO control (vehicle) condition, with a dose-dependent effect (**Figure 2b**). Similar results were obtained in another cell line (T84) (**Figure S3A-B**). Hence, global HDAC inhibition increases the ability of AIEC bacteria to invade IECs, indicating that a physiological HDAC activity is essential to limit the entry of AIEC pathobiont bacteria within IECs.

#### **HDAC1 and HDAC5 oppositely control the entry of AIEC bacteria within host cell**

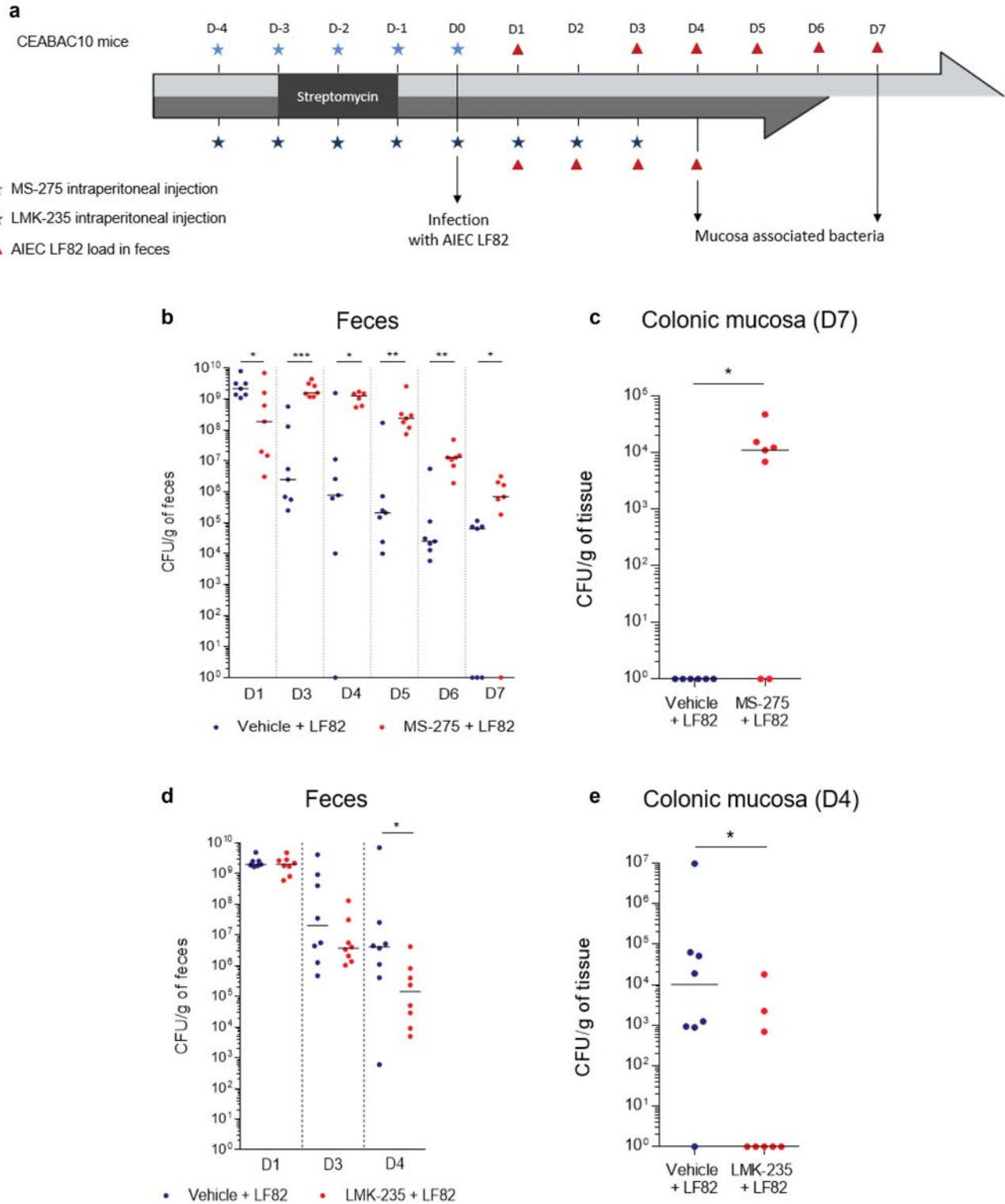
SAHA treatment leads to a global HDAC inhibition. Hence, to identify which HDAC are specifically involved in the regulation of invasion process, Caco-2 cells were transfected with siRNAs directed against the different classical HDAC (class I: HDAC1, 2, 3, 8 and class II: HDAC4, 5, 6, 7) to knock-down their expression. Efficacy of siRNAs was ensured by western blot (**Figure S2C**). Cells were infected with AIEC 48 h after transfection, and no difference in the adhesion ability was observed following the knock-down of the different HDAC, confirming that HDAC do not regulate AIEC adhesion to IECs (**Figure 2c, d**). However, we observed that significantly more bacteria invaded IECs following the silencing of HDAC1 compared to the control condition siScr (mean siScr:  $1.09 \times 10^5$  CFU/wells vs mean siHDAC1:  $1.90 \times 10^5$  CFU/wells,  $p < .001$ ) (**Figure 2e**). In contrast, less invasive AIEC LF82 bacteria were numbered in cells with silenced HDAC5 compared to control condition (mean siScr:  $1.09 \times 10^5$  CFU/wells vs mean siHDAC5:  $6.54 \times 10^4$  CFU/wells,  $p < .05$ ) (**Figure 2f**). We obtained equivalent

results in T84 cell line (**Figure S3C**). These results demonstrate that HDAC1 and HDAC5 control the entry of AIEC bacteria within host cells but in opposite ways: HDAC1 limits AIEC entry within host cells, whereas HDAC5 promotes the invasion process. Similar results were obtained with three others AIEC strains, suggesting that HDAC-mediated control of AIEC invasion is a common mechanism to AIEC pathobionts (**Figure S4**).

#### **Class I HDAC inhibition favors AIEC colonization but HDAC5 inhibition limits AIEC colonization in vivo**

To confirm our *in vitro* data, CEABAC10 transgenic mice, overexpressing the human *CEACAM6* gene used by AIEC to bind IECs,<sup>40,41</sup> were daily intraperitoneally injected with MS-275, a class I HDAC inhibitor, during 5 days to inhibit HDAC1. MS-275 treatment efficacy in colonic epithelium was confirmed by analysis of global acetylation level of histone H3 by western blot (**Figure S5**). Mice were then infected with the AIEC strain LF82 and intestinal colonization was followed up (**Figure 3a**). From day 3 post-infection until the end of the experimentation, significantly more bacteria were present in the stools from MS-275-treated mice compared to feces from control mice receiving only the vehicle of the inhibitor (**Figure 3b**). Moreover, significantly more AIEC bacteria associated with the colonic mucosa were numbered in MS-275-treated mice compared to control mice for which no AIEC bacteria were associated with the colonic mucosa 7 days post-infection (median Vehicle + LF82: 1.00 CFU/g of tissue vs median MS-275 + LF82:  $1.11 \times 10^4$  CFU/g of tissue,  $p < .05$ ) (**Figure 3c**). These results show that MS-275-treated mice are more susceptible to AIEC infection than mice treated with the vehicle. Thus, class I HDAC activity is required to prevent AIEC intestinal colonization *in vivo*.

A similar experiment was conducted in CEABAC10 mice which were daily intraperitoneally injected with LMK-235, a selective inhibitor of HDAC4 and HDAC5, during the whole experiment in order to block HDAC5 activity. Mice were infected after 5 days of treatment with the AIEC strain LF82 and intestinal colonization was studied (**Figure 3a**). At day 4 post-infection, significantly



**Figure 3.** Class I HDAC activity prevents AIEC colonization whereas HDAC4/5 activity favors AIEC colonization *in vivo*. **a:** Experimental protocols of treatment and infection used in the study. **b-e:** AIEC LF82 load in feces at different days post-infection (b, d) and AIEC LF82 bacteria associated with colonic mucosa 7 days (c) or 4 days post-infection (e) were quantified on selective agar plates (n = 7 or 8). Bars represent medians. Mann-Whitney test, \*p < .05, \*\*p < .01, \*\*\*p < .001.



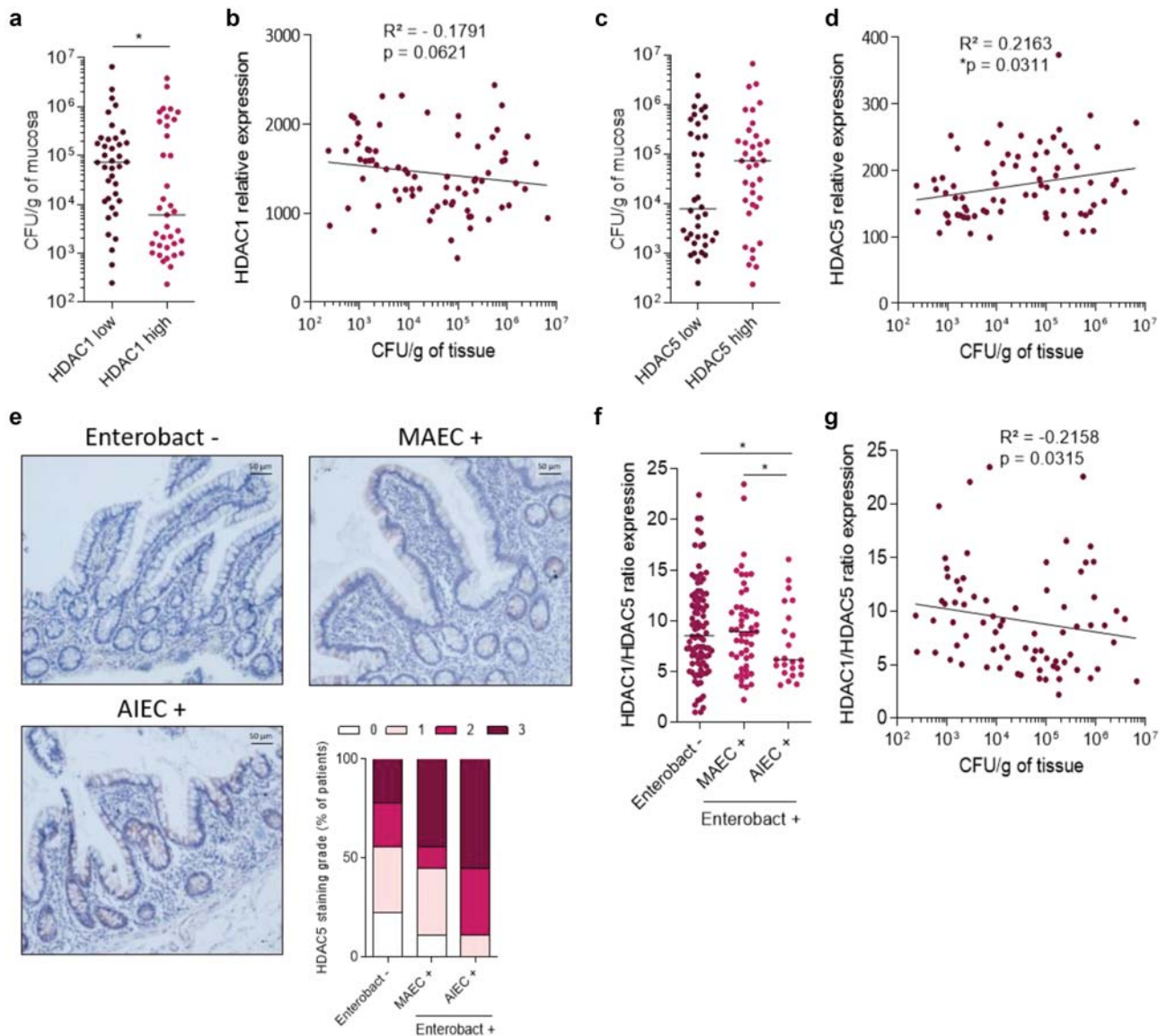
less AIEC bacteria were present in the feces of LMK-235-treated mice compared to feces of vehicle-treated mice (median Vehicle + LF82:  $4.12 \times 10^6$  CFU/g of feces vs median MS-275 + LF82:  $1.44 \times 10^5$  CFU/g of feces,  $p < .05$ ) (Figure 3d). Also, significantly less bacteria associated with the colonic mucosa in LMK-235-treated mice were numbered at day 4 post-infection, compared to control mice (median Vehicle + LF82:  $1.01 \cdot 10^4$  CFU/g of feces vs median MS-275 + LF82: 1.00 CFU/g of feces,  $p < .05$ ) (Figure 3e). These results demonstrate that LMK-235 inhibitor favors AIEC clearance reducing mice susceptibility to AIEC infection. Hence, *in vivo*, HDAC5 activity promotes AIEC intestinal colonization. Therefore, these experiments demonstrate the opposite role of class I HDAC, HDAC1 particularly, and HDAC5 in the regulation of AIEC intestinal colonization with a protective role of HDAC1, and a detrimental part of HDAC5 confirming our observations in cellular model.

#### **HDAC1 and HDAC5 expression correlate with Enterobacteria load associated with ileal mucosa in CD patients**

As we identified the roles of HDAC1 and HDAC5 in the control of the entry of AIEC bacteria within host cells, we then addressed the relationship existing between HDAC1, HDAC5 expression and Enterobacteria in CD patients' ileal mucosa. To this aim, REMIND cohort transcriptomic analysis was used to determine HDAC1 and HDAC5 expression levels in ileal mucosa<sup>42</sup> as well as quantification of Enterobacteria load from ileal mucosa samples from each 171 samples (Table S1 and Figure S6). CD patients colonized by Enterobacteria (MAEC + and AIEC +) were split into two groups based on their HDAC1 expression level (50% of patients with high HDAC1 expression and 50% of patients with low HDAC1 expression, the cutoff value used was the median of HDAC1 expression level). Interestingly, we observed that patients having HDAC1 low expression were significantly more colonized by Enterobacteria compared to patients with high HDAC1 expression (median HDAC1 low: 73 846 CFU/g vs median HDAC1 high: 6 154 CFU/g,  $p < .05$ ) (Figure 4a). Moreover, HDAC1 expression negatively correlated with Enterobacteria load

associated with inflamed ileal mucosa although the correlation did not reach significance ( $p = .0621$ ) (Figure 4b). The same analysis was performed using HDAC5 expression levels. We observed an increase in Enterobacteria load in inflamed ileal mucosa of CD patients expressing high level of HDAC5, compared to patients' mucosa with low HDAC5 expression level (Figure 4c). Interestingly, a statistically significant positive correlation was observed between HDAC5 expression level and Enterobacteria load associated with ileal mucosa ( $p = .031$ ) (Figure 4d). These results support our *in vitro* data and further confirm that HDAC1 and HDAC5 expression levels are involved in the control of the load of Enterobacteria associated with ileal mucosa in CD patients.

AIEC bacteria were identified by phenotypical characterization in CD patients' ileal samples from the REMIND cohort and patients were split into three groups: Enterobact -: patients non-colonized by Enterobacteria ( $n = 95$ ), MAEC +: patients colonized by mucosa-associated *E. coli* (MAEC) ( $n = 51$ ), AIEC +: patients colonized by AIEC ( $n = 25$ ). HDAC5 expression level was studied by immunostaining. We observed that the intensity of HDAC5 signal was higher in AIEC + patients compared to MAEC + patients and patients non-colonized by Enterobacteria (Enterobact -: 44.4% of samples with signal intensity  $\geq 2$ , MAEC +: 55.6% of samples with signal intensity  $\geq 2$  vs AIEC +: 88.9% of samples with signal intensity  $\geq 2$ ), demonstrating an association between HDAC5 high expression and AIEC colonization (Figure 4e and Figure S7). Interestingly, the HDAC1/HDAC5 ratio expression was significantly lower in AIEC-carrier CD patients compared to MAEC+ CD patients and patients non-colonized by Enterobacteria (figure 4f). These observations suggest that low HDAC1 expression and high HDAC5 expression could favor AIEC selection and colonization in CD patients and that imbalance between HDAC1 and HDAC5 expression could predispose CD patients to be colonized by AIEC bacteria. Also, the HDAC1/HDAC5 ratio expression negatively correlated with Enterobacteria load associated with inflamed ileal mucosa ( $p = .0315$ ), suggesting that HDAC1/HDAC5 ratio expression could be predictive of the Enterobacteria load and AIEC colonization in CD patients (Figure 4g).

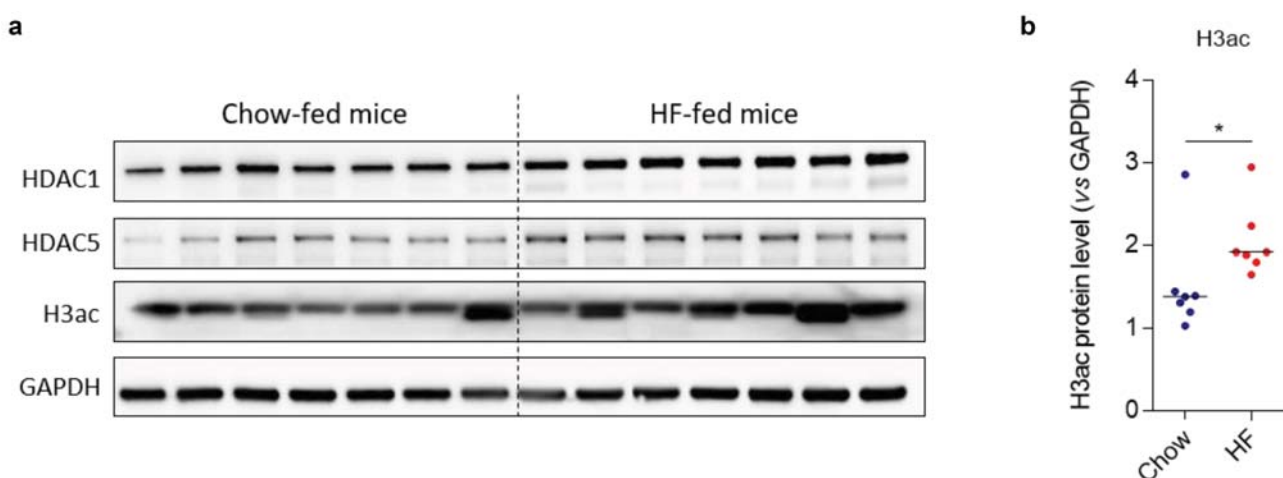


**Figure 4. HDAC1 and HDAC5 expression is correlated with Enterobacteria load associated with ileal mucosa.** HDAC1 and HDAC5 expression levels and Enterobacteria load were quantified in mucosa samples of CD patients from the REMIND cohort. **a:** CD patients' ileal samples were split into two groups based on HDAC1 expression level (50% in HDAC1 low expression group and 50% in HDAC1 high expression group). The load of Enterobacteria associated with ileal mucosa in each group is plotted on the graph. The results are median. Mann-Whitney test,  $*p < .05$ . **b:** Correlation between HDAC1 expression level and Enterobacteria load associated with ileal mucosa. **c:** CD patients' ileal samples were split into two groups based on HDAC5 expression level (50% in HDAC5 low expression group and 50% in HDAC5 high expression group). The load of Enterobacteria associated with ileal mucosa in each group is plotted on the graph. **d:** Correlation between HDAC5 expression level and Enterobacteria load associated with ileal mucosa. **e:** Immunohistochemical staining of HDAC5 on mucosa samples from patients non-colonized by Enterobacteria (Enterobact -), colonized by mucosa-associated *E. coli* (MAEC +) and colonized by AIEC bacteria (AIEC +). The intensity of the signal in samples was rated as following: 0- no signal, 1- low intensity signal, 2- high intensity signal, 3- very strong intensity signal ( $n = 9$  samples/group) **f:** HDAC1/HDAC5 ratio expression in ileal mucosa of CD patients based on the absence of Enterobacteria associated with the mucosa (Enterobact -), the presence of mucosa-associated *E. coli* (MAEC +) and the presence of AIEC (AIEC +). Bars represent medians. Mann-Whitney test,  $*p < .05$ . **g:** Correlation between HDAC1/HDAC5 ratio expression and Enterobacteria load associated with ileal mucosa. Correlation existing between two variables was assessed by a Spearman test (one-tailed).

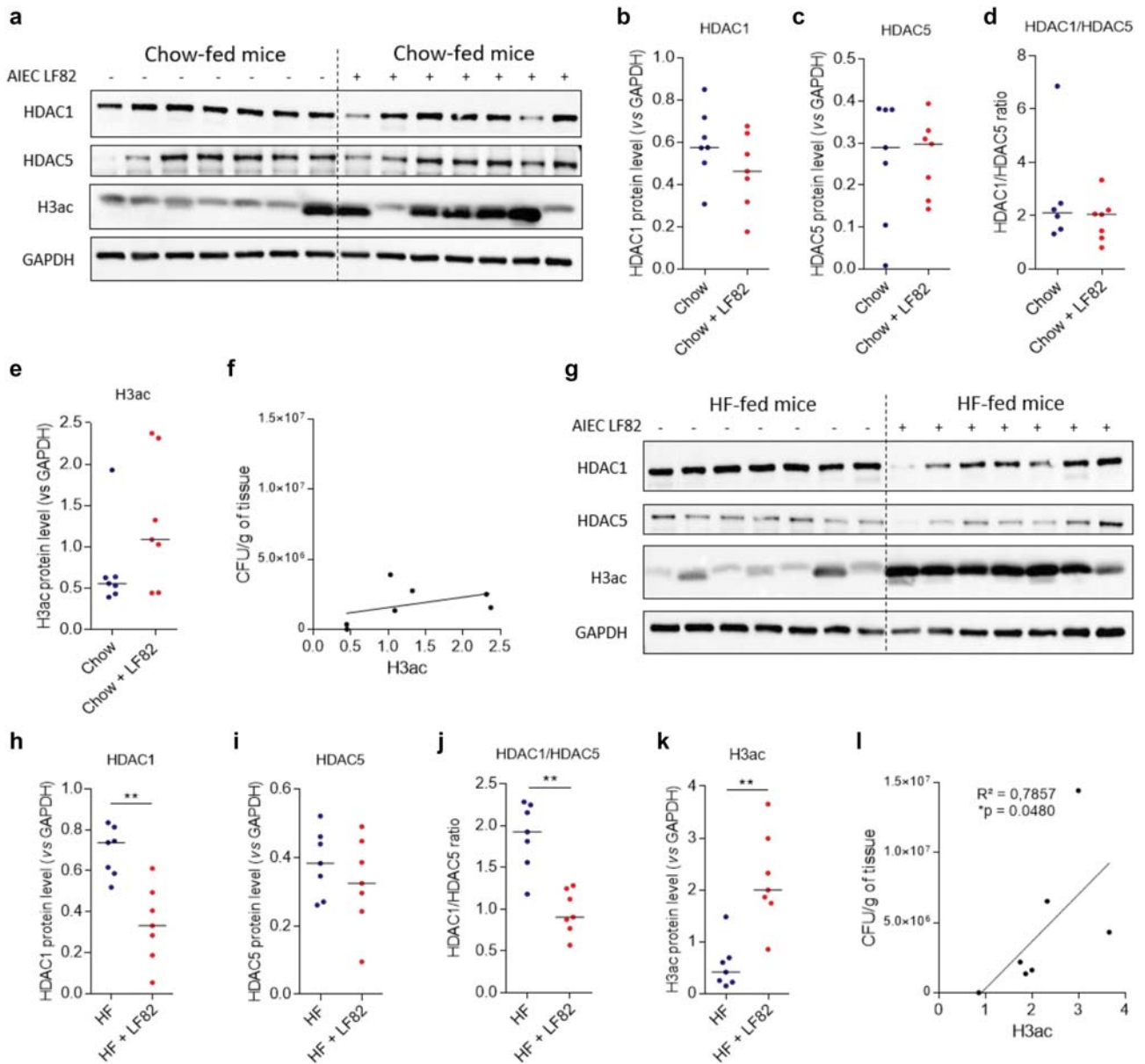
### AIEC infection alters host epigenome in HF-fed mice, enhancing AIEC intestinal colonization

So far, we demonstrated that the levels expression of HDAC1 and HDAC5 control the ability of pathobiont Enterobacteria to interact with the intestinal mucosa. However, we now need to understand the causes of the disequilibrium of HDAC expression in CD patients. It is known that the consumption of a diet enriched in fats, sugar with a reduced proportion of fibers is an environmental factor associated with a higher risk to develop CD.<sup>3-7</sup> We hypothesize that diet could be responsible for the deregulation of HDAC1 and HDAC5 expression. Hence, we fed mice with a high-fat (HF) diet enriched in fats during 4 weeks and studied HDAC1 and HDAC5 expression as well as the global acetylation level of the histone H3 by western blot. A light but significant increase in global acetylation level of H3 in colonic mucosa of HF-fed mice compared to mice fed a standard diet (Chow diet) was observed (median Chow: 1.381 vs median HF: 1.918,  $p < .05$ ), whereas no significant change in HDAC expression was noticed between the two groups of mice (Figure 5). Since HF diet alters the intestinal barrier function allowing bacteria to reach the epithelium,<sup>16,17</sup> we assessed the effect of a HF diet on the ability of AIEC bacteria to modulate histone acetylation *in vivo*. The infection with AIEC bacteria did neither induce significant modulations of

HDAC1 and HDAC5 expression nor modification of H3 global acetylation in colonic mucosa of Chow-fed mice (Figure 6a-f). In contrast, in colonic mucosa of HF-fed mice, AIEC bacteria infection led to a significant decrease in HDAC1 expression (median HF: 0.738 vs median HF + LF82: 0.332,  $p < .01$ ) and to a significantly reduced HDAC1/HDAC5 ratio (median HF: 1.925 vs median HF + LF82: 0.904,  $p < .01$ ), associated with a significant H3 hyperacetylation, which are the conditions we identified as promoting AIEC gut colonization (Figure 6g-k). Interestingly, we observed a positive correlation between H3 acetylation level and the load of AIEC bacteria associated with the colonic mucosa of HF-fed mice, similar to what we observed in CD patients (Figure 6l). Hence, these results indicate that HF diet creates a specific micro-environment in the gut allowing AIEC bacteria to reach intestinal epithelial cells and to modulate the host epigenome to its advantage, enabling invasion of host cells. We then confirmed the requirement of a HF-altered gut environment to allow AIEC-induced epigenetic alterations. Under infection with AIEC bacteria, a significant decrease in HDAC1 expression (median Chow + LF82: 0.759 vs median HF + LF82: 0.456,  $p < .05$ ), an increase in HDAC5 expression as well as a significantly reduced HDAC1/HDAC5 ratio (median Chow + LF82: 6.016 vs median HF + LF82: 2.682,  $p < .01$ ) associated with H3 hyperacetylation were observed



**Figure 5.** High-fat diet alters histone H3 acetylation in mice. **a:** Western blot targeting HDAC1, HDAC5 expression and H3ac mark in colonic mucosa of mice fed Chow or High-fat (HF) diet. **b:** Quantification of protein expression was performed by assessing band intensities using the Image Lab software ( $n = 7$  mice/per group). Bars represent medians. Mann-Whitney test,  $*p < .05$ . H3ac: acetylated H3.



**Figure 6.** AIEC infection alters host epigenome in HF-fed mice, enhancing AIEC colonization. **a:** Western blot targeting HDAC1, HDAC5 and H3ac expression in colonic mucosa of Chow-fed mice uninfected or infected with AIEC strain LF82. **G:** HDAC1, HDAC5 and H3ac accumulation in colonic mucosa of HF-fed mice uninfected or infected with AIEC strain LF82 analyzed by western blot. **b-e, h-k:** Quantification of protein expression was performed by assessing band intensities using the Image Lab software ( $n = 7$  mice/group). Bars represent medians. Mann-Whitney test,  $**p < .01$ . **f, l:** Correlation between AIEC LF82 load associated with the colonic mucosa of Chow-fed mice (**f**) or HF-fed mice (**l**) and global H3 acetylation level. Correlation existing between two variables was assessed by a Spearman test. H3ac: acetylated H3.

in colonic mucosa of HF-fed mice compared to Chow-fed mice (**Figure S8**).

## Discussion

CD patients are abnormally colonized by AIEC bacteria in ileal mucosa but the molecular mechanisms responsible for this increased susceptibility to

carry AIEC bacteria are incompletely characterized. In this study, we first observed that H3 histone was more acetylated in patients colonized by AIEC bacteria compared to patients non-colonized by Enterobacteria or by MAEC bacteria. This observation led us to focus our study on the role of acetylation epigenetic regulators, such as histone deacetylases or HDAC, to determine whether



these players could have a role in the susceptibility of IECs to be colonized by Enterobacteria and more specifically by AIEC pathobiont bacteria. We observed that global HDAC inhibition favored the entry of AIEC within intestinal cells, demonstrating that HDAC activity limits the AIEC invasion process within host cells. In the literature, Eskandrian et al.<sup>33</sup> demonstrated that HeLa cells treated with a global HDAC inhibitor, Trichostatin A, were more prone to be infected by the invasive bacteria *L. monocytogenes* than untreated cells,<sup>43</sup> suggesting that regulation of infection by HDAC could be a common mechanism to invasive bacteria. In the work of Mombelli et al.,<sup>44</sup> global HDAC inhibition altered antibacterial defense of macrophages by reducing the phagocytosis and the killing of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by mouse bone marrow-derived macrophages. Moreover, HDAC inhibition resulted in a decreased bacteria-induced production of reactive oxygen and nitrogen species by macrophages. Similarly, Corrèa et al.<sup>45</sup> showed that short-chain fatty acids and SAHA/MS-275 treatment altered phagocytic and killing bacteria capacities of neutrophils in mice infected with a pathogenic bacteria. These results strengthen the crucial role of HDAC in the control of infection by pathogens in different cell types.

The silencing of the different HDAC showed that two HDAC in particular, HDAC1 and HDAC5, regulate bacterial invasion process: while HDAC1 limits the AIEC entry within host cells, HDAC5 favors it. In the REMIND cohort of CD patients, we observed that in inflamed ileal mucosa, patients with low level of HDAC1 and high level of HDAC5 were more colonized by Enterobacteria and carried AIEC. Interestingly, a lower HDAC1/HDAC5 ratio expression was associated with the presence of AIEC in the subgroup of Enterobacteria-colonized patients. Since no transgenic mouse model mimicking AIEC ileal colonization are currently available, the transgenic CEABAC10 mice model, which reproduces the AIEC colonic colonization, was used in this study. In this *in vivo* model, we demonstrated that mice treated with MS-275 were more prone to AIEC infection compared to untreated mice, whereas LMK-235-treated

mice were less susceptible to infection compared to control mice confirming the role of class I HDAC and HDAC5 in AIEC intestinal colonization. Hence, it appears that HDAC1/HDAC5 balance expression regulates host susceptibility to be colonized by Enterobacteria. Through promotion of intestinal inflammation, Enterobacteria colonization enhances the risk to select AIEC bacteria, the presence of these pathobiont bacteria associated with the patients' ileal mucosa increasing the risk of relapse 6-month post-surgery as recently demonstrated by Buisson et al.<sup>39,46,47</sup>

Based on our data, two potential therapeutic strategies to limit Enterobacteria, and more specifically AIEC bacteria colonization could be to (1) activate HDAC1 expression/activity in intestinal epithelial cells or to (2) limit HDAC5 activity. However, the latter strategy seems more realistic than the former, as specific HDAC5 inhibitors have already been developed and used in different studies. Indeed, specific targeting of HDAC5 with HDAC5 silencing or a specific HDAC5 inhibitor (LMK-235) was used in an *in vivo* sepsis model and it resulted in improved mice survival and intestinal permeability, and in a reduced intestinal dysfunction.<sup>48</sup> These data strengthen the hypothesis that HDAC5 inhibition could represent an interesting therapeutic alternative in the treatment of intestinal diseases. Short-chain fatty acids (SCFA), mainly acetate, propionate and butyrate, are known microbiota-derived HDAC inhibitors and play an important role in the regulation of intestinal inflammation.<sup>49</sup> However, the molecular mechanism leading to the protective effect of butyrate is not completely understood yet. It was demonstrated that butyrate induces disruption of the subcellular nuclear localization of HDAC5 while in another study, it was shown that butyrate attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy I in rats through the inhibition of HDAC5.<sup>50,51</sup> Hence, these studies clearly highlighted that butyrate can have an effect on HDAC5 activity and suggest that the beneficial effect of butyrate in IBD could be mediated through HDAC5 inhibition. It is also important to keep in mind that HDAC

are global regulators of genes expression and modulating such proteins activities could eventually lead to uncontrolled adverse effects. Therefore, it appears important to perform transcriptomic analysis to try to identify specific genes which could be involved in the control of AIEC entry within host cells in order to better understand the link between HDAC and AIEC colonization and to discover new potential target genes.

The higher incidence of CD in industrialized countries, where people are more exposed to smoking, westernized diet, air pollution or chronic stress, than in in-development countries directed us to consider that some environmental factor could alter HDAC1/HDAC5 expression. We focused the study on the effect of the consumption of a western diet enriched in fats and sugar due to its association with a higher risk to develop CD and its detrimental effect on the intestinal barrier function and microbiota promoting AIEC gut colonization.<sup>16</sup> We demonstrated that mice-fed a HF diet presented an increase in global H3 acetylation level although no significant change in HDAC1 and HDAC5 expression was observed. This increased acetylation level can be the result of a decreased expression of others HDAC or the consequence of a reduced HDAC activity in HF-fed mice undetectable by western blot. AIEC infection resulted in a decreased HDAC1/HDAC5 ratio associated with H3 hyperacetylation only in mice fed a HF diet. These misregulations were not observed in Chow-fed mice. Hence, consumption of a western diet impairs the gut homeostasis, creating a specific intestinal environment. This enables AIEC bacteria to reach the intestinal epithelium where they can alter the expression of epigenetic master regulators HDAC1 and HDAC5 to promote their entry within the host and to favor their colonization.

In this work, we highlighted the central role of chromatin global regulators, HDAC, in the interaction between Enterobacteria and intestinal epithelial cells in ileal mucosa of CD patients. Indeed, the balance between HDAC1 and HDAC5 expression levels controls the ability of pathobiont Enterobacteria to interact

with intestinal mucosa. We also demonstrated that HF diet creates a specific micro-environment within the gut which favors AIEC access to the epithelium where they can modulate the host epigenome to their advantage in order to colonize (Figure 7). With these results, a food rebalancing toward a Mediterranean diet, which includes high-fiber foods associated with a reduced consumption of fats and sugar, could limit AIEC gut colonization by restricting intestinal deregulations promoting AIEC access to the epithelium and subsequent AIEC-induced HDAC imbalance. We could also imagine combining HDAC5 targeting strategies with this healthier diet in order to increase the chances to limit Enterobacteria and AIEC colonization of the ileal mucosa in CD patients and prevent relapses.

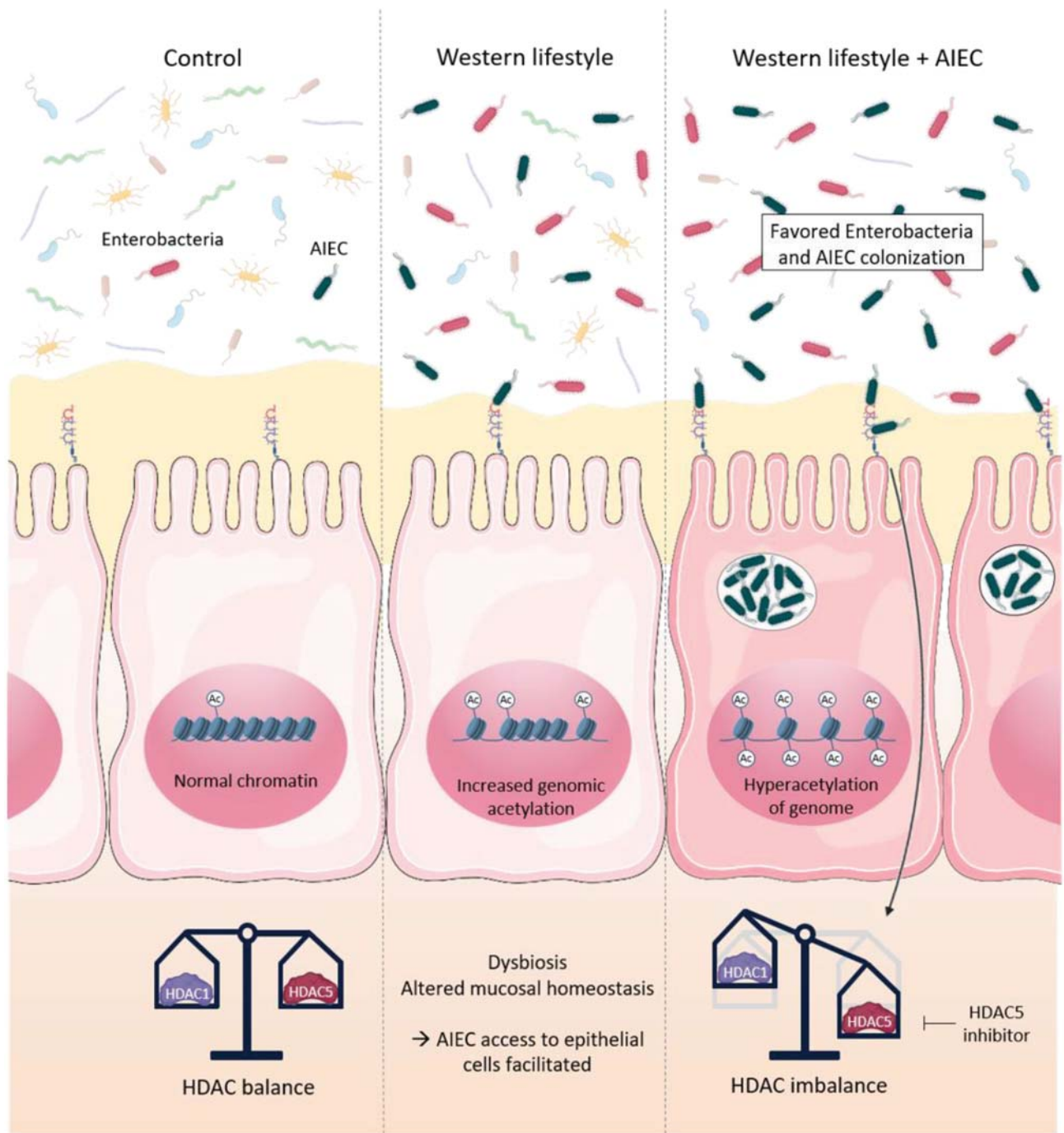
## Materials and methods

### *In vitro experiments*

#### *Intestinal epithelial cells culture and inhibitor treatment*

Intestinal epithelial cells Caco-2, TC7 clone, were cultivated in DMEM medium supplemented with 20% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Dutscher), 2 mM of glutamine (Gibco), vitamins (1%, Dutscher), amino acids (1%, Fisher) and antibiotics cocktail (penicillin, streptomycin, Amphotericin B, 1%, HyClone). Intestinal epithelial cells T84 were cultivated in DMEM/F12 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Dutscher), 2 mM of glutamine (Gibco), vitamins (1%, Dutscher), 10 mM of HEPES (Dutscher) and antibiotics cocktail (penicillin, streptomycin, Amphotericin B, 1%, HyClone). Cells were seeded into 24-well culture plates at a density of  $1.10^5$  cells/well (Caco-2) or  $4.10^5$  cells/well (T84) in a medium depleted of antibiotics and were incubated at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 h. Cells were treated with suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, Sigma), a global HDAC inhibitor, prepared in DMSO at different doses (0.4/0.8/1.6/3.125/6.25/12.5 μM) during 24 h.





**Figure 7.** HDAC1 and HDAC5 control Enterobacteria colonization in ileal mucosa of CD patients. The HDAC1/HDAC5 expression balance is crucial in the control of the interaction between Enterobacteria and intestinal epithelial cells in ileal mucosa of CD patients, a reduced HDAC1 expression associated with an increased expression of HDAC5 being conditions favoring Enterobacteria and AIEC gut colonization. Consumption of a high-fat diet leads to alterations of global H3 acetylation level and creates a specific micro-environment that allows AIEC bacteria to reach intestinal epithelium. In this environment, AIEC bacteria are able to imbalance HDAC1 and HDAC5 expressions to their advantage to colonize the gut mucosa. Targeting HDAC5 could represent an interesting approach to prevent AIEC colonization in CD patients. Ac: acetylation.

**Viability assay**

SAHA cytotoxicity was assessed with a XTT Cell Viability Kit (30007, Biotium®) after a 24 h-treatment according to the

manufacturer’s instructions. Briefly, 100 µL of activated XTT solution were added on each well. After 5 h of incubation, absorbance was measured at 450 nm and 630 nm.

### **siRNA transfection**

Cells were seeded into 24-well culture plates at a density of  $3.5 \times 10^4$  cells/well (Caco-2) or  $2.10^5$  cells/well (T84) in a medium depleted of antibiotics 24 h before transfection. For each condition, siRNA and Lipofectamine® 2000 (Caco-2) or RNAiMAX (T84) (Invitrogen) were separately diluted in Opti-MEM Reduced Serum Media (Gibco) and incubated 5 min at room temperature before mixing (V/V, final concentration = 10 nM). After 20 min of incubation at room temperature, medium in each well was replaced with 200 µL of the mix and cells were incubated during 6 h at 37°C/CO<sub>2</sub> 5%. Transfection was stopped by addition of 800 µL/well of medium and cells were incubated 48 h at 37°C/CO<sub>2</sub> 5%.

### **Bacterial strains, adhesion-invasion assays on IECs**

AIEC strain LF82 used for all the experiments was isolated from a chronic ileal lesion of a patient with CD<sup>11</sup> as well as the AIEC strains CEA614S, CEA618U and CEA212U.<sup>52</sup> The day of infection, cells were washed twice with PBS before infection with the AIEC strains at a multiplicity of infection (MOI) of 100 bacteria per cell. At 3 h post-infection, cells were washed twice with PBS and lysed with Triton 1X and serial dilutions of the lysates were plated on LB gelosis to number adhesive bacteria. For invasion assay, a gentamicin protection assay was performed to number invasive bacteria. Briefly, medium was replaced at 3 h post-infection with medium supplemented with gentamicin (100 µg/mL) to kill extracellular bacteria. After 1 h of incubation, cells were lysed and invasive bacteria were numbered after dilution and plating of the lysates on LB gelosis.

### **In vivo experiments**

#### **Mice treatments**

FVB/N female wild-type (WT) and CEABAC10 transgenic mice<sup>40</sup> were maintained in our animal care facilities at the University Clermont Auvergne (Clermont-Ferrand, France).

CEABAC10 mice were daily intraperitoneally-injected with MS-275 (5 months, 20 mg/kg, Selleckchem) during 5 days (n = 7) or with LMK-235 (6 weeks, 6 mg/kg, Sigma) during 8 days (n = 8).

Mice used as controls only received the vehicle of the inhibitor (MS-275: 4% DMSO, 30% PEG300, distilled water (n = 7); LMK-235: 3.2% DMSO, 30% PEG300, 5% Tween 80, distilled water, n = 8) (Figure 3a).

WT mice (8 weeks) were fed either a standard diet (Chow diet, A04, SAFE®) or a high-fat diet (HF diet) enriched in fats (U8957 Version 1, SAFE®) during 4 weeks. At the end of the 4 weeks, one half of mice were sacrificed and colon was collected.

All infected mice received either the inhibitor or the vehicle, the broad-spectrum antibiotic streptomycin in drinking water (2.5 g/L) during 2 days to disrupt normal resident bacteria of intestinal microbiota and were orally challenged 24 h later with  $1.10^9$  AIEC LF82 bacteria cultured overnight in LB medium. Mice were sacrificed 7 (MS-275), 4 (LMK-235) or 8 (HF diet) days after infection.

#### **Follow-up of intestinal colonization by AIEC**

AIEC LF82 in stools were counted regularly post-infection by homogenization in PBS and numeration on selective agar plates containing Ampicillin (100 µg/mL) and Erythromycin (20 µg/mL). The day of sacrifice, colons were collected and washed in PBS. One centimeter was homogenized in 1 mL of PBS and serial dilutions were plated on selective agar plates to count mucosa-associated bacteria. Results are expressed in colony forming unit (CFU)/g of feces or CFU/g of tissue.

#### **Analysis on CD patients: the REMIND cohort**

##### **Description of the REMIND cohort**

Patients data are from a multicenter prospective study (9 centers) conducted by the REMIND group (REcherche sur les Maladies INflammatoires Digestives) which aimed to identify predictors of early post-operative endoscopic recurrence.<sup>53</sup> Briefly, CD's patients older than 18 years old, presenting ileal or ileocolonic CD and undergoing CD-related ileocolonic resection in absence of intestinal dysplasia or cancer were enrolled (Table S1). Mucosal samples were collected from the ileal side of the surgical specimen in the macroscopically inflamed area. All samples were stored at -80°C, at Nice Hospital Biobank (BB-0033-00025), University Côte d'Azur, France.

### **Numbering of *E. coli* associated with ileal mucosa of CD patients**

Samples collected during surgery were washed in phosphate-buffered saline (PBS), crushed (Ultra-Turrax, IKA) and incubated for 15 minutes on a tube rotator at room temperature in the presence of Triton 0.1X. Serial dilutions were then plated on the CPS differential medium (on which *E. coli* is pink, *Klebsiella* blue) or on selective Drigalski agar medium to quantify all the cultivable Gram-negative bacilli (mainly Enterobacteria). Results are expressed in CFU/g of ileal mucosa. *E. coli* identification was validated by mass spectrometry.

### **Identification of AIEC bacteria in ileal biopsies of CD patients**

First, a pre-screening test was conducted on 45 *E. coli* strains previously isolated from ileal biopsies. After mixing, the global abilities of these strains to invade intestine-407 epithelial cells (I-407, ATCC) were assessed. Briefly, a maximum of 45 strains per sample were equitably and extemporaneously mixed prior infection of I-407 cells at a MOI of 100 bacteria/cell. After 3 h of infection, a 1 h-treatment with gentamicin (100 µg/mL) was performed to kill extracellular bacteria. Cells were then lysed using Triton 1X and internalized *E. coli* of each mixture were numbered on agar plates. The *E. coli* K-12 strain (non-AIEC strain) was used as negative control whereas the AIEC reference strain LF82 served as positive control. AIEC bacteria from samples with an invasion rate greater than 0.1% of the original inoculum were characterized. AIEC characterization consisted in the analysis of the abilities of at least 4 *E. coli* strains per patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells as well as to survive and replicate within macrophages. Hence, gentamicin protection assays were conducted on I-407 epithelial cell line and THP-1 macrophages (ATCC) as previously described.<sup>11</sup>

### **Immunohistochemical staining**

Mucosal samples were embedded into paraffin and 5 µm sections were cut with a microtome. After unwaxing and rehydration of tissues, antigens retrieval was performed with citrate buffer (10 mM, pH 6). Endogenous peroxidases were blocked in PBS with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3% during 30 min and unspecific sites were blocked using PBS with

BSA 1% for 1 h. Polyclonal rabbit pan-H3ac antibody (1/1000, #61637, Active Motif) or HDAC5 antibody (1/500, #sc-133106, Santa Cruz Biotechnology) were diluted in PBS with BSA 0.1% and incubated overnight at room temperature. Tissues were incubated 1 h at room temperature with a biotinylated secondary antibody diluted in PBS with BSA 0.1% before 30 min of incubation with peroxidase-conjugated streptavidin. For revelation, Novared revelation kit (SK-4800, Vector) was used and tissues were counterstained with Mayer's hematoxylin. Tissue were then dehydrated and slides were mounted using Cytoseal<sup>TM</sup> 60. Slides were scanned with Zeiss AxioScan Z1 (Carl Zeiss) and H3ac-positive (staining, brown nuclei) and H3ac-negative (unstained, blue nuclei) cells were counted manually. For HDAC5 staining, the intensity of the signal was rated as following: 0- no signal, 1- low intensity signal, 2- high intensity signal, 3- very strong intensity signal (**Figure S7**).

### **Microarray experiments for measurement of gene expression in ileal mucosa of CD patients**

Total RNA was extracted using TRizol reagent and purified using RNeasy micro kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Using a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific), absorbance at 260 nm and 280 nm was measured to determine the quantity and purity of total extracted RNA. Quality of samples was then checked with the Caliper LabChip GX High-Throughput Bioanalyzer (Life Sciences). Microarray data were generated using the Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays, which comprise 54 675 probe sets as described.<sup>42</sup> The microarray raw data were pre-processed to obtain log<sub>2</sub> expression value and normalized using robust multi-array average (RMA) method as implemented in the affy R package. Batch effect removal was performed using SVA R package to correct for technical batch effects.

### **Western blot and antibodies**

Proteins of treated Caco-2 cells were extracted with the addition of 300 µL/well of lysis buffer (60 mM Tris HCl pH 6.8, SDS 2% (v/v), glycerol 10%, DTT (w/v) 0.3%, bromophenol blue). Whole cell extracts were sonicated (ON: 15s; OFF: 15s; 3 cycles) and



proteins were boiled 10 min at 98°C. For colonic protein, one centimeter of mucosa was extracted and suspended in cell lysis buffer (60 mM Tris HCl pH 6.8, SDS 2% (v/v), glycerol 10%) supplemented with protease inhibitor (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche). Whole cell extracts were sonicated as previously and Laemmli buffer was added to proteins (1:4) before boiling (5 min at 98°C).

Proteins were loaded in a 12% SDS-PAGE gel for electrophoresis migration and were transferred to a nitrocellulose membrane (Trans-Blot® Transfer System, Bio-Rad). After 1 h of incubation in blocking buffer (PBS-Tween 20 0.05%, 5% BSA), membranes were blotted with the primary antibodies anti-H3K9ac, anti-H3ac (1/3000, #61251, #61637, Active Motif), anti-HDAC1, anti-HDAC2, anti-HDAC3, anti-HDAC4, anti-HDAC6, anti-HDAC7 (1/2000, #5356, #2540, #3949, #15164, #7612, #33418, Cell Signaling Technologies), anti-HDAC5 (1/2000, #20458, Cell Signaling Technologies (only in **Figure S2**) or 1/500, #sc-133106, Santa Cruz Biotechnology), anti-HDAC8 (1/2000, #ab187139, Abcam) and anti-GAPDH (1/5000, #5174, Cell Signaling Technologies) overnight at 4°C. Membranes were washed 3 times with PBS-Tween 20 0.05% and then incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies diluted in blocking buffer (1/10000) for 1 h at room temperature. Membranes were washed 3 times and proteins were detected using ECL substrate (Enhanced ChemiLuminescence, Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad). Bands intensities were quantified using Image Lab software (Bio-Rad).

### Statistics

Values are expressed as the mean  $\pm$  SD of 'n' number of experiments or median. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 for Windows version 6.07 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) software package for PC. Unpaired Mann-Whitney test was realized for single comparisons. Ordinary one-way ANOVA corrected with Tukey's test was performed for multiple comparisons. A value of  $p < .05$  was considered as statistically significant. Spearman test was used for correlations analysis.

### Study approval

Animal protocols were approved by the Committee for Research and Ethical Issues of the C2E2A ("Comité d'éthique pour l'expérimentation animale Auvergne" N°002, APAFIS#18723-20190130215 42445 and #33490-2021101815102774). All experiments were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations.

The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki, Good Clinical Practice and applicable regulatory requirements including patient informed consent. The human study was approved by the local Ethics Committees "Comité de protection des personnes Île-de-France IV-CPP 2009/17".

### Acknowledgment

We would like to thank Christelle Soubeyrand-Damon from the Anipath platform for her help with immunohistochemical analysis. We would like to thank Lukas Ortiz, Elia Ragot and Alexandra Rezard who took part of this project and Abdelkrim Alloui from animal facility. We thank all investigators of the REMIND group who contributed to this project.

### Disclosure statement

The authors report there are no conflict of interest to declare.

### Funding

This study was supported by the Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, Inserm (UMR 1071), INRAe (USC-2018), by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, "Contrat doctoral," ECO201906008953), by Agence Nationale de la Recherche (ANR, Project ANR-21-CE14-0014-01), by the Association François Aupetit (AFA) and INRAE MICA department « Projet exploratoire » Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale "Programme Transversal Microbiote. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

### ORCID

Adeline Sivignon  <http://orcid.org/0000-0003-2288-2959>  
 Anthony Buisson  <http://orcid.org/0000-0002-6347-409X>  
 Matthieu Allez  <http://orcid.org/0000-0002-2012-7522>  
 Lionel Le Bourhis  <http://orcid.org/0000-0002-7524-3539>  
 Nicolas Barnich  <http://orcid.org/0000-0001-9465-7844>  
 Jérémy Denizot  <http://orcid.org/0000-0003-0078-8996>

## Data availability statement

Microarrays raw data used in this study are from Ngollo et al<sup>42</sup> and have been deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible through GEO accession number (GSE186582 - Expression data from intestinal mucosa of patients with Crohn disease). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE186582>

## Author contribution

Experiments were initially conceived by JD and MC, who also performed western blot and *in vitro* experiments. AS generated and genotyped mice, JD and MC performed inhibitor treatment, bacterial infection, colonization follow up and immunostaining with the help of FD. Patient's samples were collected by AB and members of the REMIND French group, transcriptomic analysis of CD patients' mucosa was performed by MA and LLB. PS performed sections on paraffin blocks, CG analyzed histology stainings. Manuscript was written by JD and MC, with contributions of most co-authors, fundings were obtained by JD and NB.

## References

- Torres J, Mehandru S, Colombel J-F P-BL. Crohn's disease. *The Lancet*. 2017;389:1741–1755. doi:10.1016/S0140-6736(16)31711-1.
- Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Wu JCY, Chan FKL, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*. 2017;390(10114):2769–2778. doi:10.1016/S0140-6736(17)32448-0.
- D'Souza S, Levy E, Mack D, Israel D, Lambrette P, Ghadirian P, Deslandres C, Morgan K, Seidman EG, Amre DK. Dietary patterns and risk for Crohn's disease in children. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14(3):367–373. doi:10.1002/ibd.20333.
- Chiba M, Nakane K, Komatsu M. Westernized diet is the most ubiquitous environmental factor in inflammatory bowel disease. *Perm J*. 2019;23(1):18–107. doi:10.7812/TPP/18-107.
- Lo C-H, Lochhead P, Khalili H, Song M, Tabung FK, Burke KE, Richter JM, Giovannucci EL, Chan AT, Ananthakrishnan AN. Dietary inflammatory potential and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2020;159(3):873–883.e1. doi:10.1053/j.gastro.2020.05.011.
- Narula N, Wong ECL, Dehghan M, Mente A, Rangarajan S, Lanus F, Lopez-Jaramillo P, Rohatgi P, Lakshmi PVM, Varma RP, et al. Association of ultra-processed food intake with risk of inflammatory bowel disease: prospective cohort study. *BMJ*. 2021;374:n1554. doi:10.1136/bmj.n1554.
- Gill PA, Inniss S, Kumagai T, Rahman FZ, Smith AM. The role of diet and gut microbiota in regulating gastrointestinal and inflammatory disease. *Front Immunol*. 2022;13:866059. doi:10.3389/fimmu.2022.866059.
- Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, Yantiss R, Orsi RH, Wiedmann M, McDonough P, Kim SG, et al. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J*. 2007;1(5):403–418. doi:10.1038/ismej.2007.52.
- Khanna S, Raffals LE. The Microbiome in Crohn's Disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017;46(3):481–492. doi:10.1016/j.gtc.2017.05.004.
- Sokol H, Brot L, Stefanescu C, Auzolle C, Barnich N, Buisson A, Fumery M, Pariente B, Le Bourhis L, Treton X, et al. Prominence of ileal mucosa-associated microbiota to predict postoperative endoscopic recurrence in Crohn's disease. *Gut*. 2020;69:462–472. doi:10.1136/gutjnl-2019-318719.
- Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser A-L, Barnich N, Bringer M-A, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel J-F. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004;127:412–421. doi:10.1053/j.gastro.2004.04.061.
- Martinez-Medina M, Aldegue X, Lopez-Siles M, González-Huix F, López-Oliu C, Dahbi G, Blanco JE, Blanco J, Garcia-Gil LJ, Darfeuille-Michaud A. Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive E. Coli (AIEC) in Crohn's Disease *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:872–882. doi:10.1002/ibd.20860.
- Palmela C, Chevarin C, Xu Z, Torres J, Sevrin G, Hirten R, Barnich N, Ng SC, Colombel J-F. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2018;67:574–587. doi:10.1136/gutjnl-2017-314903.
- Denizot J, Sivignon A, Barreau F, Darcha C, Chan HFC, Stanners CP, Hofman P, Darfeuille-Michaud A, Adherent-invasive BN. *Escherichia coli* induce claudin-2 expression and barrier defect in CEABAC10 mice and Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18:294–304. doi:10.1002/ibd.21787.
- Chervy M, Barnich N, Denizot J. Adherent-Invasive E. Coli: Update on the Lifestyle of a Troublemaker in Crohn's Disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21:3734.
- Martinez-Medina M, Denizot J, Dreux N, Robin F, Billard E, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A, Barnich N. Western diet induces dysbiosis with increased *E coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut*. 2014;63:116–124. doi:10.1136/gutjnl-2012-304119.
- Agus A, Denizot J, Thévenot J, Martinez-Medina M, Massier S, Sauvanet P, Bernalier-Donadille A, Denis S, Hofman P, Bonnet R, et al. Western diet induces a shift

- in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. Coli* Infection and Intestinal Inflammation. *Sci Rep.* 2016;6:19032.
18. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, et al. Reduced Paneth cell  $\alpha$ -defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:18129–18134. doi:10.1073/pnas.0505256102.
  19. Wehkamp J, Stange EF. Paneth's disease. *J Crohns Colitis.* 2010;4:523–531. doi:10.1016/j.crohns.2010.05.010.
  20. Stappenbeck TS, McGovern DPB. Paneth cell alterations in the development and phenotype of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2017;152(2):322–326. doi:10.1053/j.gastro.2016.10.003.
  21. Alkaiissi LY, Winberg ME, Heil SDS, Haapaniemi S, Myreliid P, Stange EF, Söderholm JD, Keita ÅV. Antagonism of Adherent Invasive *E. Coli* LF82 with Human  $\alpha$ -defensin 5 in the Follicle-associated Epithelium of Patients with Ileal Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2020;27:1116–1127.
  22. McPhee JB, Small CL, Reid-Yu SA, Brannon JR, Le Moual H, Coombes BK. Host defense peptide resistance contributes to colonization and maximal intestinal pathology by Crohn's disease-associated adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2014;82(8):3383–3393. doi:10.1128/IAI.01888-14.
  23. Lin Z, Hegarty JP, Cappel JA, Yu W, Chen X, Faber P, Wang Y, Kelly AA, Poritz LS, Peterson BZ, et al. Identification of disease-associated DNA methylation in intestinal tissues from patients with inflammatory bowel disease. *Clin Genet.* 2011;80(1):59–67. doi:10.1111/j.1399-0004.2010.01546.x.
  24. Ventham NT, Kennedy NA, Adams AT, Kalla R, Heath S, O'Leary KR, Drummond H, Wilson DC, Gut IG, Nimmo ER, et al. Integrative epigenome-wide analysis demonstrates that DNA methylation may mediate genetic risk in inflammatory bowel disease. *Nat Commun.* 2016;7(1):13507. doi:10.1038/ncomms13507.
  25. Howell KJ, Kraiczky J, Nayak KM, Gasparetto M, Ross A, Lee C, Mak TN, Koo B-K, Kumar N, Lawley T, et al. DNA methylation and transcription patterns in intestinal epithelial cells from pediatric patients with inflammatory bowel diseases differentiate disease subtypes and associate with outcome. *Gastroenterology.* 2018;154(3):585–598. doi:10.1053/j.gastro.2017.10.007.
  26. Somineni HK, Venkateswaran S, Kilaru V, Marigorta UM, Mo A, Okou DT, Kellermayer R, Mondal K, Cobb D, Walters TD, et al. Blood-Derived DNA methylation signatures of Crohn's disease and severity of intestinal inflammation. *Gastroenterology.* 2019;156(8):2254–2265.e3. doi:10.1053/j.gastro.2019.01.270.
  27. Moret-Tatay I, Cerrillo E, Sáez-González E, Hervás D, Iborra M, Sandoval J, Busó E, Tortosa L, Nos P, Beltrán B. Identification of epigenetic methylation signatures with clinical value in Crohn's disease. *Clin Transl Gastroenterol.* 2019;10(10):e00083. doi:10.14309/ctg.0000000000000083.
  28. Serena C, Millan M, Ejarque M, Saera-Vila A, Maymó-Masip E, Núñez-Roa C, Monfort-Ferré D, Terrón-Puig M, Bautista M, Menacho M, et al. Adipose stem cells from patients with Crohn's disease show a distinctive DNA methylation pattern. *Clin Epigenetics.* 2020;12(1):53. doi:10.1186/s13148-020-00843-3.
  29. Hornschuh M, Wirthgen E, Wolfien M, Singh KP, Wolkenhauer O, Däbritz J. The role of epigenetic modifications for the pathogenesis of Crohn's disease. *Clin Epigenetics.* 2021;13(1):108. doi:10.1186/s13148-021-01089-3.
  30. Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(4):a018713. doi:10.1101/cshperspect.a018713.
  31. Park S-Y, Kim J-S. A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Exp Mol Med.* 2020;52(2):204–212. doi:10.1038/s12276-020-0382-4.
  32. Turgeon N, Blais M, Gagné J-M, Tardif V, Boudreau F, Perreault N, Asselin C. HDAC1 and HDAC2 restrain the intestinal inflammatory response by regulating intestinal epithelial cell differentiation. *PLoS ONE.* 2013;8(9):e73785. doi:10.1371/journal.pone.0073785.
  33. Turgeon N, Gagné JM, Blais M, Gendron F-P, Boudreau F, Asselin C. The acetylome regulators Hdac1 and Hdac2 differently modulate intestinal epithelial cell dependent homeostatic responses in experimental colitis. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* 2014;306(7):G594–605. doi:10.1152/ajpgi.00393.2013.
  34. Gonneaud A, Turgeon N, Jones C, Couture C, Lévesque D, Boisvert F-M, Boudreau F, Asselin C. HDAC1 and HDAC2 independently regulate common and specific intrinsic responses in murine enteroids. *Sci Rep.* 2019;9(1):5363. doi:10.1038/s41598-019-41842-6.
  35. Gonneaud A, Turgeon N, Boisvert F-M, Boudreau F, Asselin C. JAK-STAT pathway inhibition partially restores intestinal homeostasis in Hdac1- and Hdac2-intestinal epithelial cell-deficient mice. *Cells.* 2021;10(2):224. doi:10.3390/cells10020224.
  36. Alenghat T, Osborne LC, Saenz SA, Kobuley D, Ziegler CGK, Mullican SE, Choi I, Grunberg S, Sinha R, Wynosky-Dolfi M, et al. Histone deacetylase 3 coordinates commensal-bacteria-dependent intestinal homeostasis. *Nature.* 2013;504(7478):153–157. doi:10.1038/nature12687.
  37. Tsaprouni LG, Ito K, Powell JJ, Adcock IM, Pouchard N. Differential patterns of histone acetylation in inflammatory bowel diseases. *Journal of Inflammation.* 2011;8(1):1. doi:10.1186/1476-9255-8-1.
  38. Friedrich M, Gerbeth L, Gerling M, Rosenthal R, Steiger K, Weidinger C, Keye J, Wu H, Schmidt F,

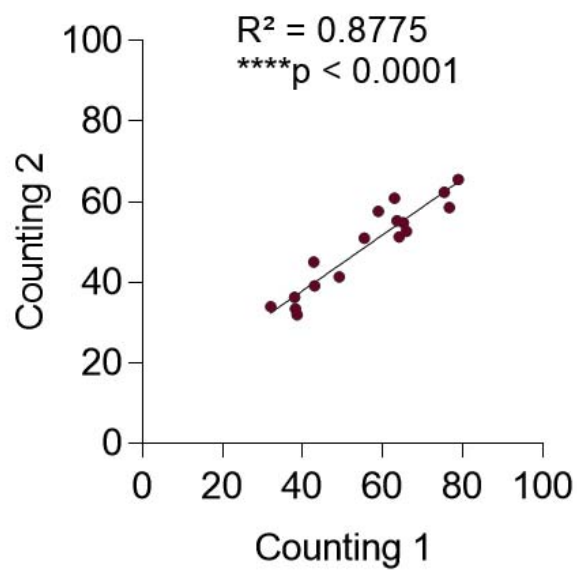


- Weichert W, et al. HDAC inhibitors promote intestinal epithelial regeneration via autocrine TGF $\beta$ 1 signalling in inflammation. *Mucosal Immunol.* 2019;12(3):656–667. doi:10.1038/s41385-019-0135-7.
39. Buisson A, Sokol H, Hammoudi N, Nancey S, Treton X, Nachury M, Fumery M, Hébuterne X, Rodrigues M, Hugot J-P, et al. Role of adherent and invasive *Escherichia coli* in Crohn's disease: lessons from the postoperative recurrence model. *Gut.* pp.gutjnl-2021-325971. 2022. doi:10.1136/gutjnl-2021-325971
  40. Chan CHF, Stanners CP. Novel mouse model for carcinoma embryonic antigen-based therapy. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2004;9(6):775–785. doi:10.1016/j.ynth.2004.03.009.
  41. Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, Darcha C, Chan CHF, Stanners CP, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med.* 2009;206(10):2179–2189. doi:10.1084/jem.20090741.
  42. Ngollo M, Perez K, Hammoudi N, Gorelik Y, Delord M, Auzolle C, Bottois H, Cazals-Hatem D, Bezault M, Nancey S, et al. Identification of gene expression profiles associated with an increased risk of post-operative recurrence in Crohn's disease. *J Crohns Colitis.* 2022;16(8):1269–80. doi:10.1093/ecco-jcc/jjac021.
  43. Eskandarian HA, Impens F, Nahori M-A, Soubigou G, Coppée J-Y, Cossart P, Hamon MA. A role for SIRT2-dependent histone H3K18 deacetylation in bacterial infection. *Science.* 2013;341(6145):1238858. doi:10.1126/science.1238858.
  44. Mombelli M, Lugrin J, Rubino I, Chanson A-L, Giddey M, Calandra T, Roger T. Histone deacetylase inhibitors impair antibacterial defenses of macrophages. *J Infect Dis.* 2011;204(9):1367–1374. doi:10.1093/infdis/jir553.
  45. Corrêa RO, Vieira A, Sernaglia EM, Lancellotti M, Vieira AT, Avila-Campos MJ, Rodrigues HG, Vinolo MAR. Bacterial short-chain fatty acid metabolites modulate the inflammatory response against infectious bacteria. *Cell Microbiol.* 2017;19(7):e12720. doi:10.1111/cmi.12720.
  46. Ormsby MJ, Logan M, Johnson SA, McIntosh A, Fallata G, Papadopoulou R, Papachristou E, Hold GL, Hansen R, Ijaz UZ, et al. Inflammation associated ethanolamine facilitates infection by Crohn's disease-linked adherent-invasive *Escherichia coli*. *EBioMedicine.* 2019;43:325–332. doi:10.1016/j.ebiom.2019.03.071.
  47. Baldelli V, Scaldaferrri F, Putignani L, Del Chierico F. The role of enterobacteriaceae in gut microbiota dysbiosis in inflammatory bowel diseases. *Microorganisms.* 2021;9(4):697. doi:10.3390/microorganisms9040697.
  48. Li B, Zhang L, Zhu L, Cao Y, Dou Z, Yu Q. HDAC5 promotes intestinal sepsis via the Ghrelin/E2F1/NF- $\kappa$ B axis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2021;35:e21368.
  49. Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, Harmsen HJM, Faber KN, Hermoso MA. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Front Immunol.* 2019;10:277. doi:10.3389/fimmu.2019.00277.
  50. Downes M, Ordentlich P, Kao H-Y, Alvarez JGA, Evans RM. Identification of a nuclear domain with deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(19):10330–10335. doi:10.1073/pnas.97.19.10330.
  51. Zhang L, Deng M, Lu A, Chen Y, Chen Y, Wu C, Tan Z, Boini KM, Yang T, Zhu Q, et al. Sodium butyrate attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy by inhibiting COX2/PGE2 pathway via a HDAC5/HDAC6-dependent mechanism. *J Cell Mol Med.* 2019;23(12):8139–8150. doi:10.1111/jcmm.14684.
  52. Buisson A, Vazeille E, Fumery M, Pariente B, Nancey S, Seksik P, Peyrin-Biroulet L, Allez M, Ballet N, Filippi J, et al. Faster and less invasive tools to identify patients with ileal colonization by adherent-invasive *E. coli* in Crohn's disease. *United European Gastroenterology Journal.* 2021;9(9):1007–1018. doi:10.1002/ueg2.12161.
  53. Auzolle C, Nancey S, Tran-Minh M-L, Buisson A, Pariente B, Stefanescu C, Fumery M, Marteau P, Treton X, Hammoudi N, et al. Male gender, active smoking and previous intestinal resection are risk factors for post-operative endoscopic recurrence in Crohn's disease: results from a prospective cohort study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018;48:924–932. doi:10.1111/apt.14944.

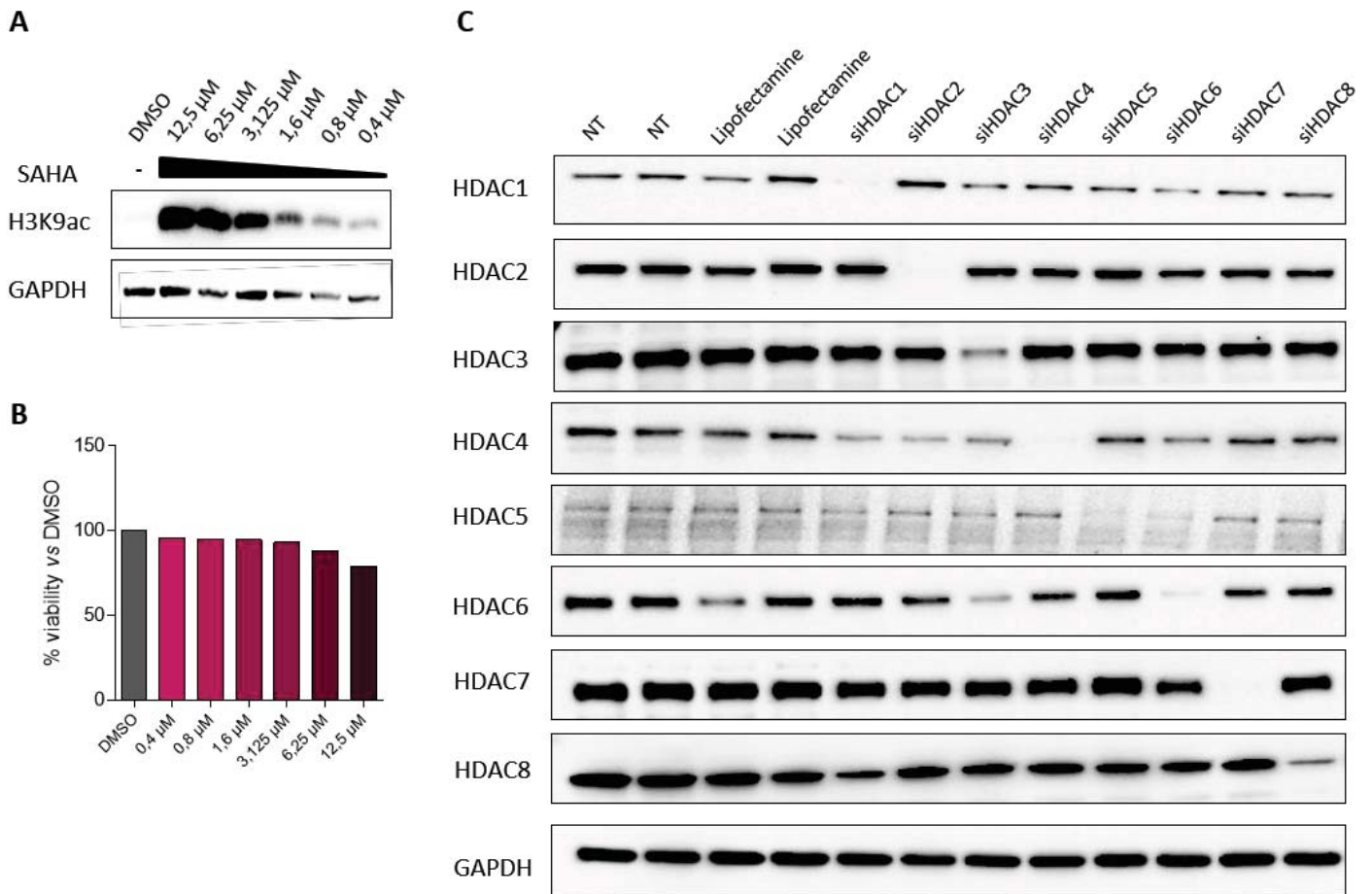
**Supplementary Table S1: Characteristics of the REMIND cohort used in this study.**

n = 171 patients	CD patients non-colonized by Enterobacteria (n=95)	CD patients colonized by MAEC Enterobacteria (n=51)	CD patients colonized by AIEC Enterobacteria (n=25)
Age at the time of surgery (mean ± SD)	32.8 ± 11.8	36.6 ± 12.5	37.6 ± 14.5 years
Disease duration (median, IQR)	4 [1.0-10.0] years	8 [2.5-15.0] years	5 [2.3-8.0] years
Female gender n (%)	51 (53.7%)	22 (43.1%)	13 (52.0%)
<b>Montreal classification</b>			
<i>Location</i>			
L1 n (%)	55 (57.9%)	35 (68.6%)	15 (60.0%)
L2 n (%)	0 (0%)	1 (2.0%)	0 (0%)
L3 n (%)	38 (40.0%)	15 (29.4%)	10 (40.0%)
L4 n (%)	2 (2.1%)	0 (0%)	0 (0%)
Perianal lesions n (%)	20 (21.1%)	12 (23.5%)	4 (16.0%)
<i>Behaviour</i>			
B1 n (%)	21 (22.1%)	5 (9.8%)	4 (16.0%)
B2 n (%)	38 (40.0%)	27 (52.9%)	17 (68.0%)
B3 n (%)	36 (37.9%)	19 (37.3%)	4 (16.0%)
Prior intestinal resection n (%)	16 (16.8%)	11 (21.6%)	7 (28.0%)
<b>Medications before surgery</b>			
No treatment n (%)	14 (14.7%)	8 (15.7%)	6 (24.0%)
Antibiotics use within 4 weeks before surgery n (%)	38 (40.0%)	12 (23.5%)	7 (28.0%)
within 3 months before surgery			
Corticothérapie n (%)	29 (30.5%)	20 (39.2%)	6 (24.0%)
Azathioprine n (%)	19 (20.0%)	24 (47.1%)	3 (12.0%)
Methotrexate n (%)	2 (2.1%)	2 (3.9%)	1 (4.0%)
Anti-TNF agents n (%)	46 (48.4%)	27 (52.9%)	15 (60.0%)

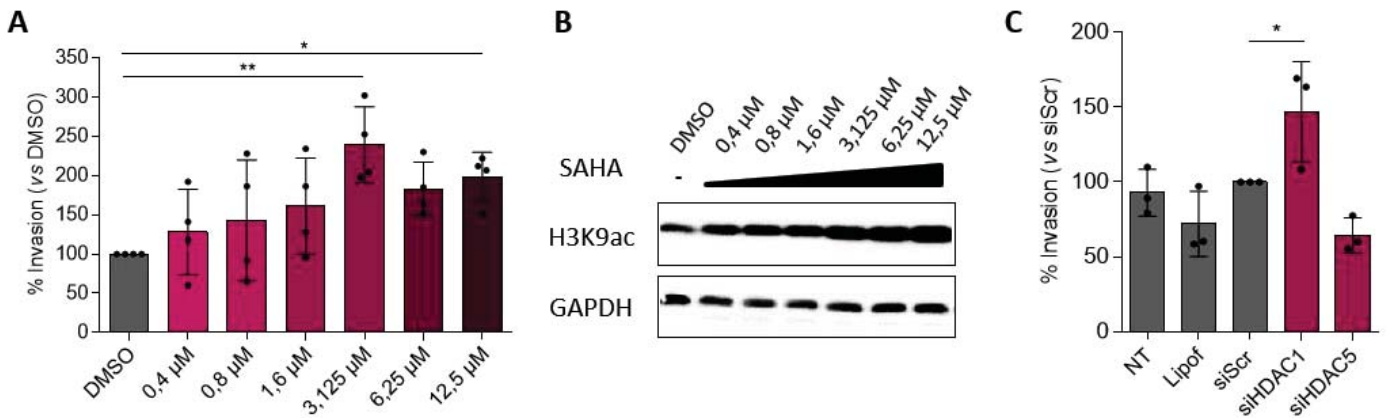
SD: standard deviation, IQR: interquartile range, n: number, TNF: Tumor Necrosis Factor



**Figure S1: Validation of the counting method.** Correlation between the results of the two countings of H3ac positive cells made by 2 different persons (n=17). Correlation existing between two variables were assessed by a Spearman test.

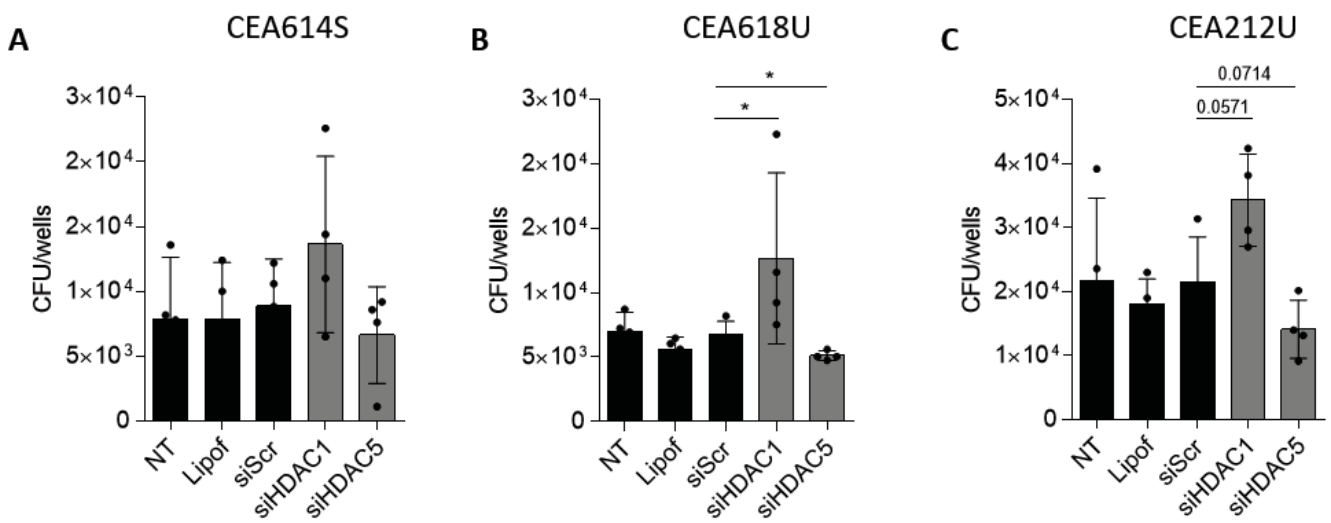


**Figure S2: Validation of the efficacy of the global HDAC inhibitor SAHA and of siRNAs.** **A:** Western blot targeting H3K9ac mark performed on Caco-2 cells treated with different concentrations of HDAC inhibitor SAHA. **B:** Cell viability was determined after 24h of SAHA treatment (n=1). **C:** Western blot performed on cells transfected with siRNA targeting the different HDAC. NT: untreated.

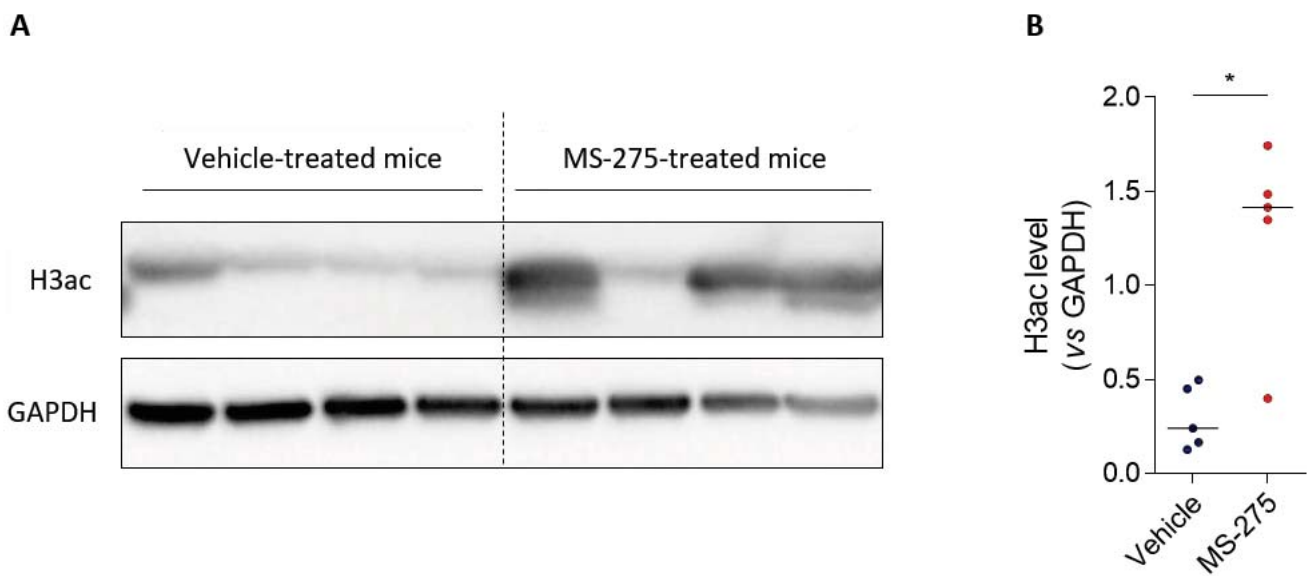


**Figure S3: Validation of the effect of the global HDAC inhibitor SAHA and siRNAs on T84 cell line** **A:** T84 cells were treated with increasing concentrations of HDAC inhibitor SAHA for 24h before infection with the AIEC strain LF82 at MOI 100. A gentamicin protection assay was performed to evaluate invasive ability of the strain in the different conditions (n=4). **B:** Western blot targeting H3K9ac mark performed on T84 cells treated with different concentrations of HDAC inhibitor SAHA. **C:** T84 cells transfected with control siRNA (siScr) or siRNA directed against HDAC1 and HDAC5 were infected with AIEC strain LF82 at MOI 100. Invasive bacteria were numbered at 4h post-infection (n=3). The results are the mean  $\pm$  SD. One-way ANOVA, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

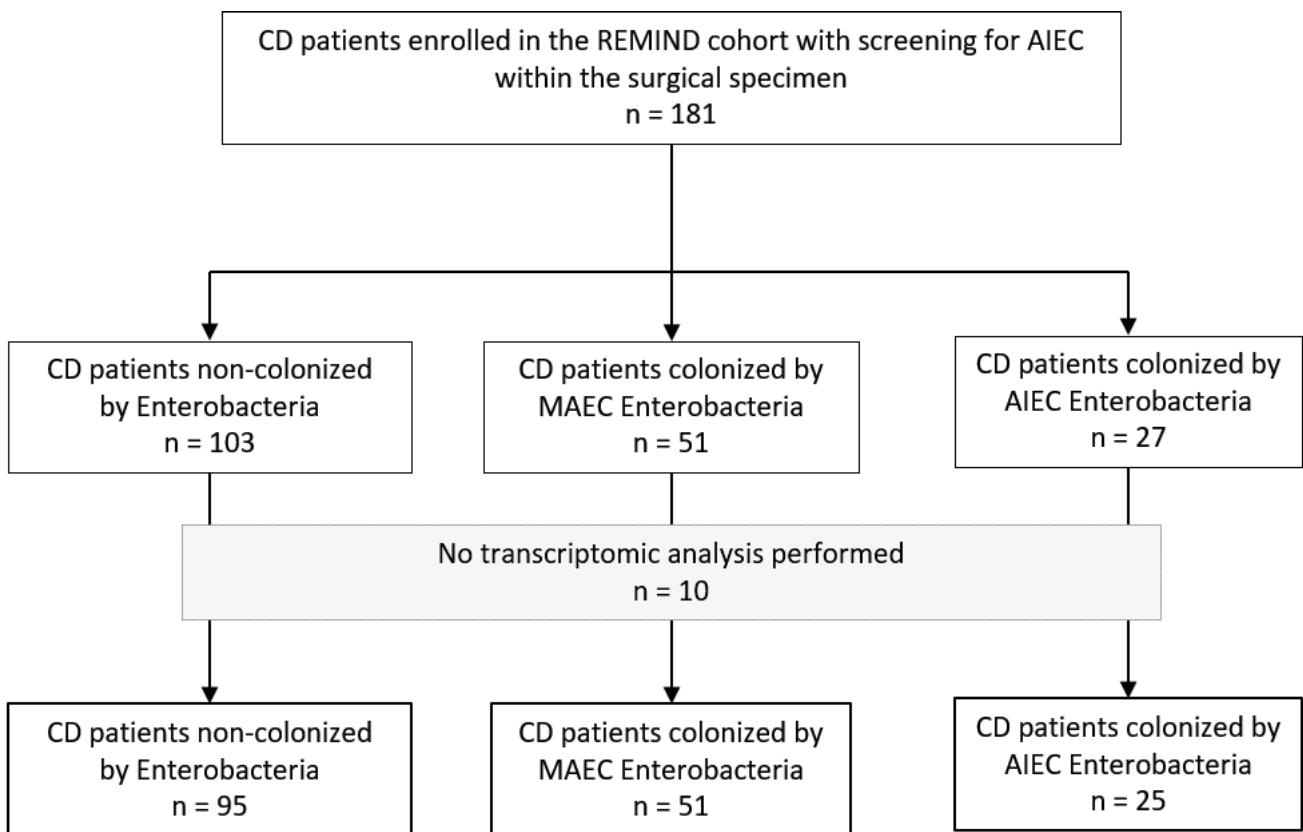




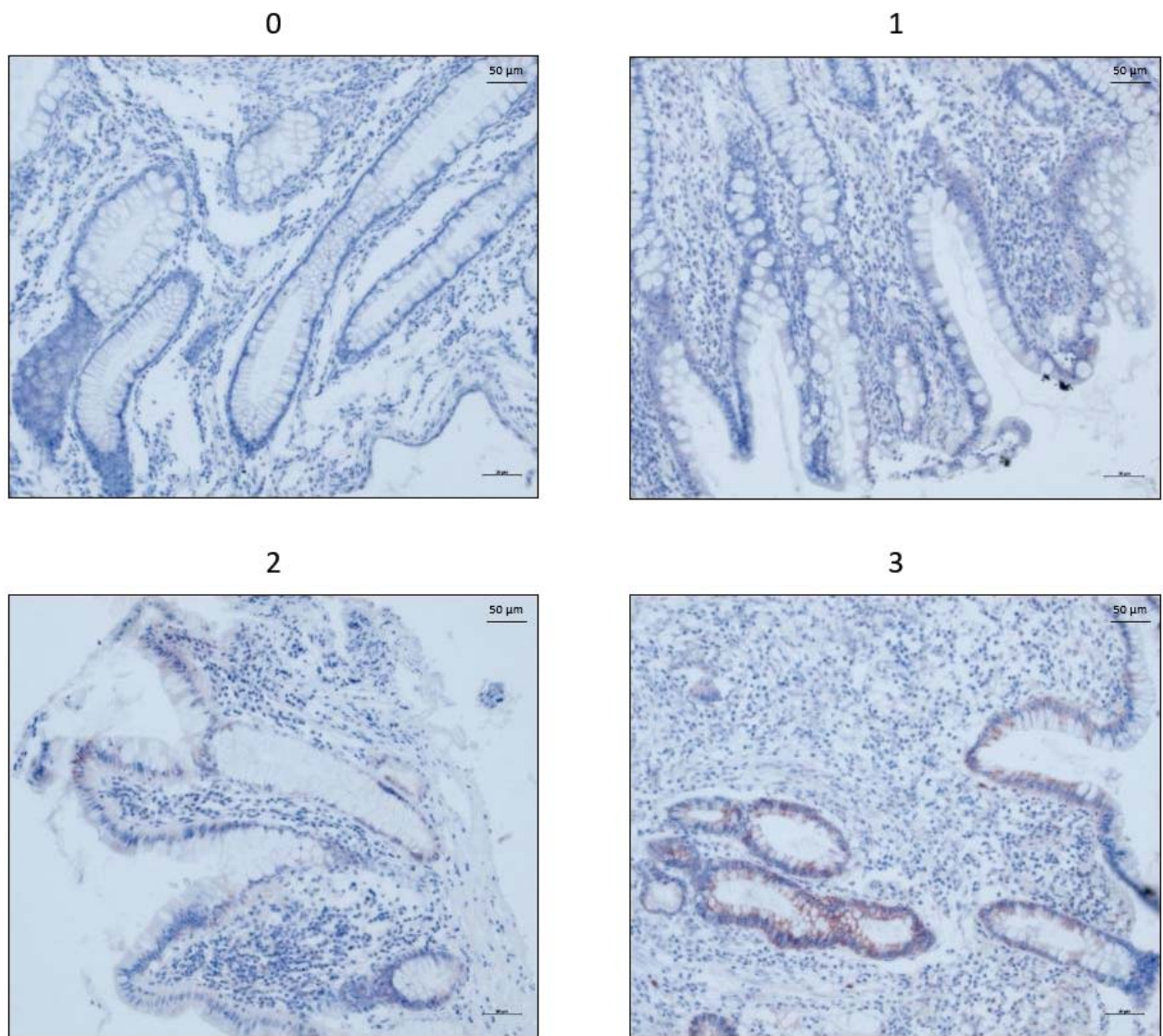
**Figure S4: HDAC1 and HDAC5 inversely regulate the invasive ability of different AIEC strains.** Caco-2 cells transfected with siRNA directed against HDAC1 and HDAC5 were infected with 3 different AIEC strains: CEA614S (A), CEA618U (B) and CEA212U (C) at MOI 100. A gentamicin protection assay was performed to measure the invasive ability of the strains in the different knocked-down conditions (n=4). The results are the mean  $\pm$  SD. Mann-Whitney test, \*p<0.05. MOI: multiplicity of infection, Lipof: lipofectamine, NT: untreated, Scr: scramble.



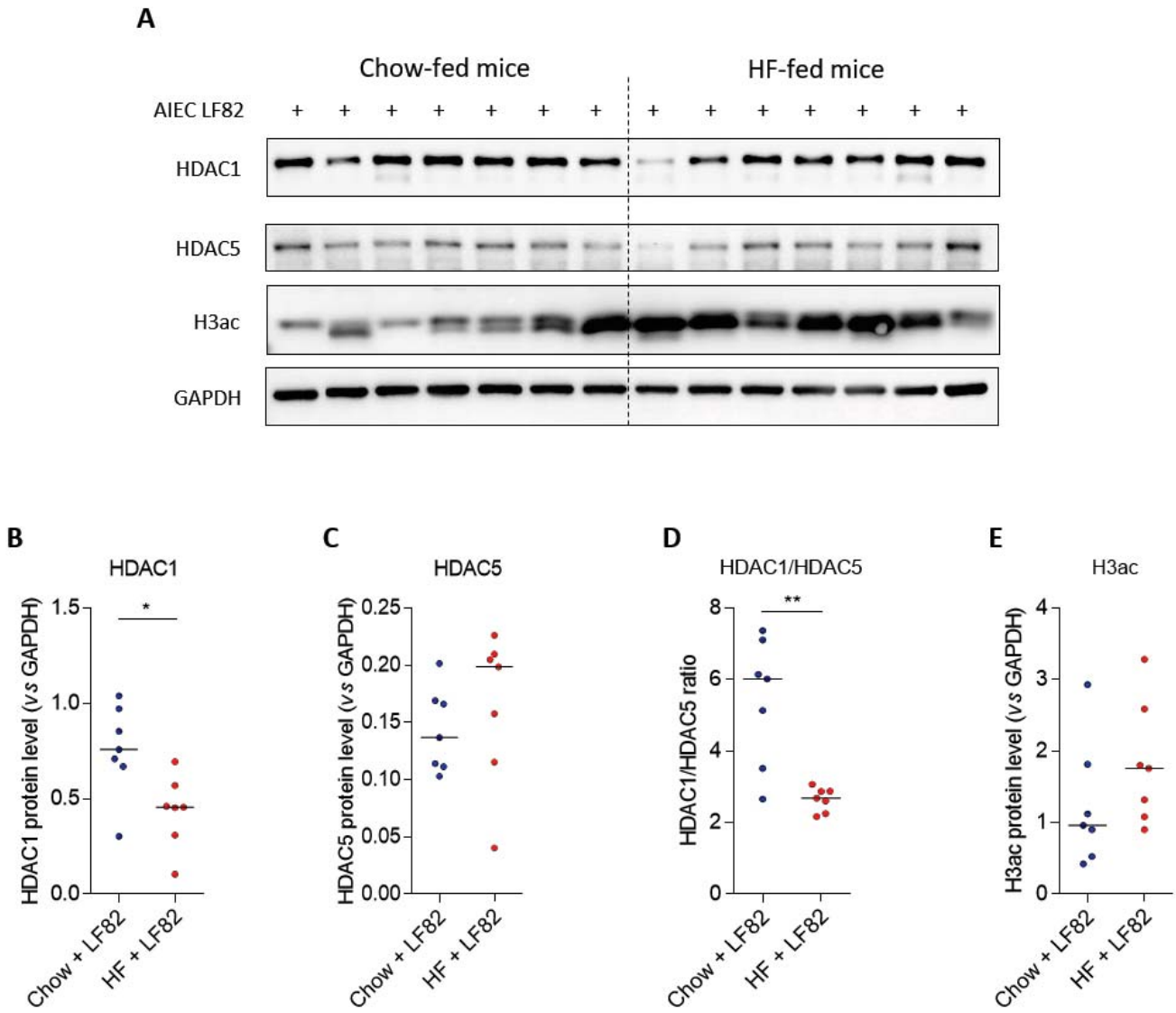
**Figure S5: Validation of the efficacy of the class I HDAC inhibitor MS-275 *in vivo*.** **A:** Western blot targeting H3ac mark performed on colonic mucosa from mice treated with 20 mg/kg/day of MS-275 for 5 days. **B:** Quantification was performed by assessing band intensities using the Image Lab software (n= 5 mice/per group). Bars represent medians. Mann-Whitney test, \*p<0.05.



**Figure S6: Presentation of the REMIND cohort.** Patients for which Enterobacteria numbering and AIEC screening within the surgical specimen and transcriptomic analysis were performed were retained for the analysis (n=171). MAEC: Mucosa-associated *E. coli*.



**Figure S7: Scoring examples of immunohistochemical staining of HDAC5 on mucosa samples from CD patients.** The intensity of the signal in samples was rated as following: 0- no signal, 1- low intensity signal, 2- high intensity signal, 3- very strong intensity signal.



**Figure S8: HF diet is required for AIEC to induce epigenetic alterations.** **A:** HDAC1, HDAC5 and H3ac expression in colonic mucosa of Chow-fed or HF-fed mice infected with AIEC strain LF82 analyzed by western blot. **B-E:** Quantification of protein expression was performed by assessing band intensities using the Image Lab software (n= 7 mice/per group). Bars represent medians. Mann-Whitney test, \*p<0.05, \*\*p<0.01. H3ac: acetylated H3.



## Commentaire de la publication n°1

---

Au cours de ce travail, il a tout d'abord été démontré que les patients colonisés par les bactéries AIEC présentaient un niveau d'acétylation de l'histone H3 plus élevé comparativement aux patients non-colonisés par des Entérobactéries ou colonisés par des MAEC (pour « Mucosa-Associated *E. coli* »). Aussi, grâce à des modèles *in vitro* et *in vivo*, nous avons démontré que l'expression de HDAC1 limitait la colonisation de la muqueuse intestinale par les AIEC alors que l'expression de HDAC5 la favorisait. D'une manière intéressante, ces résultats ont pu être confirmés dans une large cohorte de patients atteints de MC. En effet, les expressions de HDAC1 et de HDAC5 corrélaient, respectivement, négativement et positivement avec la quantité d'Entérobactéries associées à la muqueuse iléale des patients atteints de MC. Nous avons aussi observé une dérégulation de l'expression de HDAC1 et HDAC5 chez les patients porteurs d'AIEC comparativement aux patients non colonisés par des Entérobactéries ou colonisés par des MAEC. À la fin de l'étude, il a été mis en évidence que les bactéries AIEC étaient capables de moduler l'épigénome de l'hôte afin de promouvoir leur colonisation intestinale, mais principalement chez des souris ayant été nourries avec un régime alimentaire enrichi en graisses, présentant un micro-environnement intestinal spécifique. Ainsi, cette étude a permis d'identifier HDAC1 et HDAC5 comme des régulateurs centraux et antagonistes de la colonisation de la muqueuse iléale par les Entérobactéries chez les patients. Le ciblage de HDAC5 apparaît désormais comme une stratégie intéressante pour limiter la colonisation intestinale par les AIEC.

Toutefois, pour confirmer les résultats obtenus, d'autres expériences sont envisageables. Tout d'abord, *in vitro*, des cellules spécifiquement délétées pour les gènes *HDAC1* ou *HDAC5* grâce au système CRISPR/Cas9, pourraient être utilisées pour étudier la capacité d'invasion des CEIs par les AIEC afin confirmer le rôle de HDAC1 et HDAC5 dans le contrôle de l'entrée des AIEC dans les cellules de l'hôte. En effet, la transfection de siARNs permet de diminuer l'expression des gènes ciblés mais il s'agit seulement d'un « knock-down », une expression résiduelle des gènes subsiste toujours. On pourrait également envisager de surexprimer les HDACs *via* la transfection de plasmides contenant les gènes *HDAC1* ou *HDAC5* et déterminer si on obtient des phénotypes inverses à ceux observés suite au « knock-down » des HDACs. Des essais dans ce sens ont été réalisés au cours de ma thèse, mais il s'est avéré que la transfection d'un plasmide portant la région codante du gène *HDAC1* sous le contrôle du promoteur CMV menait à la mort des cellules transfectées. Il est probable qu'une expression trop importante de HDAC1 soit délétère pour la cellule. Un promoteur moins fort ou inductible sera utilisé pour les futures manipulations.

*In vivo*, nous avons traité les animaux avec des inhibiteurs de HDACs. Toutefois, le MS-275 est un inhibiteur des HDACs de classe I et le LMK-235 est également capable d'inhiber HDAC4. Ainsi, il serait intéressant de valider nos résultats en réalisant nos expérimentations sur des souris n'exprimant

plus *HDAC1* ou *HDAC5* dans les CEIs. Il n'est pas possible d'utiliser des souris présentant un « knock-out » (KO) total de *HDAC1* ou *HDAC5* puisque ces souris sont, respectivement, non viables ou présentent des défauts cardiaques. Il faudrait avoir recours à des souris déficientes pour *HDAC1* ou *HDAC5* spécifiquement dans les CEIs (KO conditionnel) en croisant des souris floxées pour *HDAC1* ou *HDAC5* (modèles murins existant) avec des souris portant le gène codant pour la recombinaison *Cre* sous le contrôle du promoteur du gène *Villin*, permettant la délétion spécifique des gènes d'intérêt dans les CEIs. La capacité des AIEC à coloniser ces souris serait ensuite étudiée afin de valider ou non les résultats obtenus avec les inhibiteurs.

En termes de perspectives, il est aussi envisagé d'étudier l'effet combiné entre le régime alimentaire enrichi en graisses et l'inhibition/la délétion de *HDAC1* ou *HDAC5* sur la colonisation intestinale par les AIEC. Cela permettrait de déterminer s'il existe un effet cumulatif entre le régime et la perte de *HDAC1* qui rendrait les souris encore plus susceptibles à l'infection, ou si l'inhibition de *HDAC5* serait suffisante pour bloquer l'effet délétère du régime HF sur la colonisation.

Grâce aux échantillons de muqueuses prélevés chez les patients de la cohorte REMIND, des analyses transcriptomiques ont pu être réalisées permettant d'étudier les niveaux d'expression des HDACs d'intérêt. Il aurait été intéressant d'étudier l'activité enzymatique des HDACs chez les patients, malheureusement pour cela, l'extraction nucléaire doit être réalisée sur des tissus frais ce qui est compliqué à mettre en place sachant qu'il s'agit d'une étude multicentrique.

Ce premier article présente le rôle des HDACs dans le contrôle de la colonisation intestinale par les bactéries AIEC et démontre l'impact d'un régime alimentaire de type occidental au niveau intestinal. Pour aller plus loin et comprendre les phénotypes observés dans cette étude, d'autres travaux ont été menés afin d'identifier les gènes et voies régulés par *HDAC1* et *HDAC5* dans l'optique de caractériser les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la régulation de la colonisation intestinale par les HDACs d'intérêt. Aussi, une étude complémentaire a été réalisée afin d'apprécier, dans l'iléon des animaux, les mécanismes facilitant la colonisation intestinale par les AIEC suite à la consommation d'un régime occidental. Les résultats obtenus sont présentés ici sous forme de résultats complémentaires.

## Résultats complémentaires de la publication n°1

---

### I. Contexte

Les résultats obtenus précédemment ont identifié HDAC1 et HDAC5 comme des acteurs épigénétiques centraux contrôlant la colonisation intestinale par les Entérobactéries et les AIEC. Ainsi, la prochaine étape est l'identification des gènes et voies régulés par ces deux HDACs afin de caractériser les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la régulation de l'implantation des bactéries AIEC dans la muqueuse intestinale par HDAC1 et HDAC5.

Dans la littérature, il a été montré que dans le modèle transgénique CEABAC10, les animaux nourris avec un régime enrichi en graisses (HF) présentaient une dysbiose, caractérisée par une expansion de la population des *E. coli*, ainsi qu'une augmentation de la perméabilité intestinale. De plus, ce régime induisait une inflammation intestinale de bas grade et favorisait la colonisation colique par les AIEC (Agus *et al.*, 2016; Martinez-Medina *et al.*, 2014). Suite à ces études et à nos résultats, nous avons cherché à comprendre comment le régime HF favorisait la colonisation intestinale en nous intéressant particulièrement à l'effet du régime HF au niveau de la muqueuse iléale, étant donné que les AIEC sont anormalement présentes au niveau de l'iléon des patients atteints de MC (Palmela *et al.*, 2018). Les résultats complémentaires présentés ici permettent de mieux comprendre les mécanismes pouvant mener à une colonisation intestinale augmentée des AIEC dans l'iléon des patients atteints de MC ayant un mode de vie occidental. De plus, ces travaux préliminaires ouvrent la voie à de futures études pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

### II. Matériel et méthodes associées aux résultats complémentaires

#### 1. Analyse des marques épigénétiques modulées par les AIEC

Les cellules Caco-2 clone TC7 ont étéensemencées en plaque 6 puits à une densité de  $1.10^6$  cellules/puits dans du milieu dépourvu d'antibiotiques 24h avant l'infection. Le lendemain, les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS avant d'être infectées avec la souche AIEC LF82 à une MOI de 100 bactéries/cellules durant 3h. De la gentamicine (100 µg/ml) a ensuite été ajoutée pendant 1h ou 3h. À la fin des temps d'infection, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS froid et congelées à sec à  $-80^{\circ}\text{C}$  avant d'être envoyées au prestataire « Active Motif » qui a réalisé les quantifications de différentes marques épigénétiques par approche Luminex®.

#### 2. Évaluation de l'activité HDAC *in vitro*

L'activité HDAC globale des cellules Caco-2 infectées a été mesurée à l'aide du kit "HDAC Fluorimetric Cellular Activity Assay" (BML-AK503, Enzo Life Sciences). Brièvement, les cellules ont étéensemencées en plaque 96 puits à une densité de  $1,7.10^4$  cellules/puits dans du milieu sans antibiotique. Après 24h d'incubation à  $37^{\circ}\text{C}/\text{CO}_2$  5%, les cellules ont été lavées avec du milieu sans

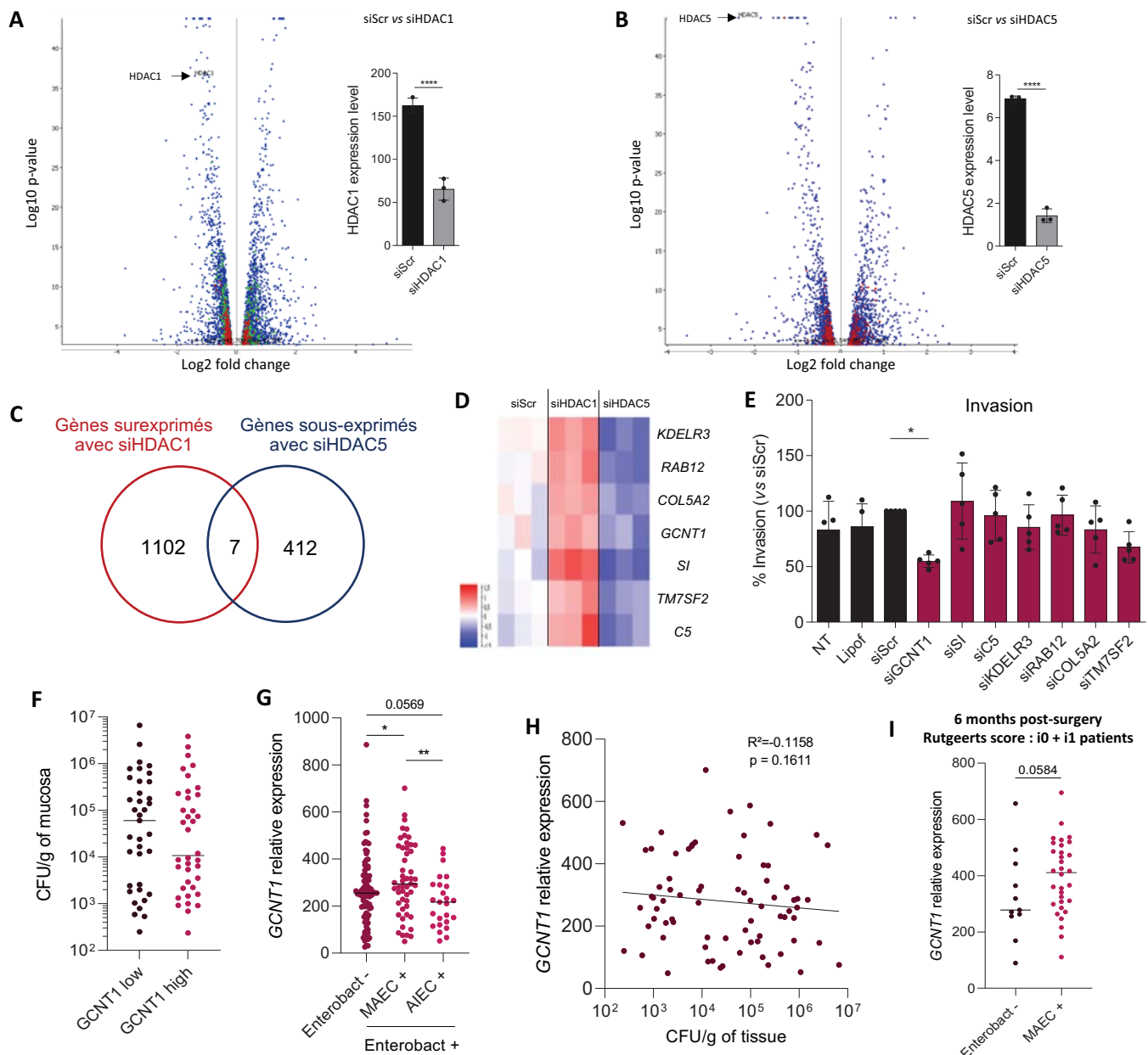
antibiotique avant d'être infectées avec la souche AIEC LF82 à une MOI de 100 durant différents temps. À la fin de l'infection, les cellules ont été lavées avec du milieu Ham's F12 dépourvu de rouge de phénol (Pan Biotech) et incubées avec le substrat acétylé Fluor de Lys® durant 2h à 37°C. Ensuite, les cellules ont été lysées et une solution de développement a été ajoutée afin de générer un signal lumineux. Après 15 min d'incubation à 37°C, la fluorescence a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque à une longueur d'onde d'excitation de 360 nm et une longueur d'onde d'émission de 460 nm.

### 3. Évaluation de l'activité HDAC dans les CEIs de l'iléon

À la fin de 4 semaines de régime enrichi en graisses, les animaux ont été sacrifiés et 2 cm d'iléon ont été prélevés. Les tissus intestinaux ont été incubés 20 min à 37°C dans du PBS supplémenté avec de l'EDTA à 1 mM, du DTT à 1 mM et 5% de sérum de veau fœtal. Après agitation, les cellules épithéliales ont été isolées par filtration grâce à un tamis cellulaire de 100 µm et le contenu nucléaire a été extrait à l'aide du kit « Nuclear Extract » (40010, Active Motif). L'activité HDAC a ensuite été mesurée sur les extraits nucléaires en utilisant le kit « HDAC assay » (56200, Active Motif) selon les instructions du fabricant. Brièvement, 8 µg d'extrait nucléaire ont été incubés avec un substrat des HDACs durant 1h à 37°C. La Trichostatine A (TSA), un inhibiteur de HDACs, a été utilisé comme contrôle négatif. La réaction de désacétylation a été stoppée par ajout d'une solution de développement. Après 15 min d'incubation à température ambiante, la fluorescence générée a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques à une longueur d'onde d'excitation de 360 nm et une longueur d'onde d'émission de 460 nm.

### 4. Séquençage des ARNm et analyse bio-informatique

Les ARNs totaux des cellules Caco-2 transfectées (+/- infectées) ou des échantillons d'iléon ont été extraits à l'aide du kit « RNeasy Mini kit » (Qiagen). Les ARNs ont été purifiés et les bibliothèques ont été générées à partir de 500 ng d'ARN total (cellules Caco-2 : RIN 8,1-10,0 ; iléon : RIN 7,7-9,5) à l'aide des réactifs « NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina » et « NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina » (New England Biolabs). Le séquençage a été réalisé sur le séquenceur « NextSeq500 » (séquençage de 75 pb en simple lecture). Les « reads » ont ensuite été alignés contre les génomes de référence humain et murin (respectivement, GRCh38 et GRCm38, version 102) à l'aide du logiciel « STAR » (<https://github.com/alexdobin/STAR>). La qualité des séquences a été évaluée grâce au logiciel Trimmomatic, 95-97% des « reads » dépassaient le seuil de qualité. Les « reads » uniques ont ensuite été analysés avec le logiciel SeqMonk version 1.44.0. Le nombre de « reads » a été quantifié sur les exons des transcrits fusionnés à l'aide de la pipeline « SeqMonk RNA-seq quantitation pipeline » (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/seqmonk/>). Les gènes différentiellement exprimés entre les conditions ont été identifiés grâce à l'algorithme DeSeq2 corrigés par des tests multiples. Une analyse « Gene Ontology » des gènes dérégulés a ensuite été réalisée *via* le logiciel disponible en ligne WebGestalt (WEB-based GENE Set AnaLysis Tool kiT ; Zhang, B) (online software (<http://www.webgestalt.org/>)).



**Figure 54 : Identification du gène *GCNT1* régulé par *HDAC1* et *HDAC5* et impliqué dans le processus d'entrée des AIEC.** Une analyse ARN-seq a été réalisée sur les ARNs issus de cellules Caco-2 transfectées avec des siARN-Scr, siARN-*HDAC1* et siARN-*HDAC5* (n=3). **A-B** : Volcano plot représentant les gènes significativement dérégulés suite au silencing de *HDAC1* (A) et de *HDAC5* (B) comparativement à la condition contrôle siScr (analyse statistique DeSeq2,  $p < 0,01$ ). Les quantifications des niveaux d'expression de *HDAC1* et *HDAC5* dans les cellules transfectées sont représentées sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type (analyse statistique DeSeq2,  $****p < 0,0001$ ). **C** : Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes surexprimés suite au silencing de *HDAC1* et le nombre de gènes sous-exprimés suite au silencing de *HDAC5*. **D** : Heatmap représentant le niveau d'expression des 7 gènes candidats dans les différentes conditions de silencing (n=3). **E** : Les cellules Caco-2 ont été transfectées avec des siARNs dirigés contre les gènes candidats et infectées avec la souche AIEC LF82 à une MOI de 100 bactéries/cellule. Un test de protection à la gentamycine a été réalisé pour dénombrer les bactéries invasives à 4h post-infection (n=5). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type. Test de Friedman corrigé avec un test de Dunn pour les comparaisons multiples (ANOVA non paramétrique païrée),  $*p < 0,05$ . **F** : Le niveau d'expression de *GCNT1* et la quantité d'Entérobactéries ont été quantifiés dans les échantillons de muqueuse iléale des patients de la cohorte REMIND. Les échantillons ont été séparés en 2 groupes en fonction du niveau d'expression de *GCNT1* (50% dans le groupe « *GCNT1* low » et 50% dans le groupe « *GCNT1* high »). La quantité d'Entérobactéries associées à la muqueuse iléale dans chaque groupe est représentée. **G** : Le niveau d'expression de *GCNT1* chez les patients est présenté en fonction de leur statut de colonisation : non colonisés par les Entérobactéries (Enterobact -), colonisés par des *E. coli* associés à la muqueuse (MAEC +) ou colonisés par des AIEC (AIEC +). Les résultats sont représentés sous la forme médiane. Test de Mann-Whitney,  $*p < 0,05$  ;  $**p < 0,01$ . **H** : Corrélation entre le niveau d'expression de *GCNT1* et la quantité d'Entérobactéries associées à la muqueuse iléale des patients. La corrélation existant entre 2 variables est évaluée par un test de Spearman. **I** : Le niveau d'expression de *GCNT1* dans des échantillons de muqueuse issus de patients ne présentant pas de lésions iléales (i0) ou présentant des formes précoces de lésions iléales (i1) à 6 mois post-chirurgie est présenté en fonction du statut de colonisation des patients par des Entérobactéries. Les résultats sont présentés sous la forme médiane. Test de Mann-Whitney. CFU : Colony Forming Unit, Lipof : lipofectamine, MOI : multiplicité d'infection, NT : non traité, Scr : Scramble.



## 5. ELISA

L'IL-8 a été dosée à partir des surnageants des cellules T84 traitées avec le MS-275 et infectées durant 3h avec la souche AIEC LF82. La lipocaline 2, Lcn2, a été quantifiée dans les fèces des animaux comme cela a été décrit précédemment (Chassaing *et al.*, 2012). Les dosages ELISA ont été réalisés à l'aide de kits commerciaux, selon les instructions du fournisseur (R&D Systems, IL-8/CXCL8 : DY208, Lcn2 : DY1857).

## III. Résultats

### 1. Identification des gènes et voies régulés par HDAC1 et HDAC5

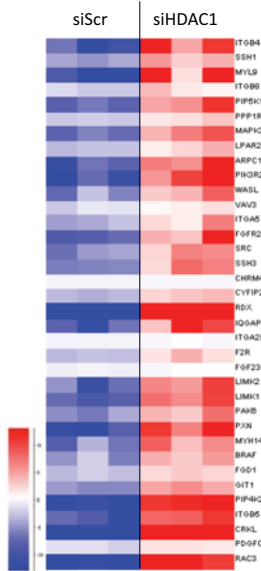
#### a. Identification des gènes régulés par HDAC1 et HDAC5 dans les cellules épithéliales intestinales

Les HDACs sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes de par leur rôle dans la désacétylation des protéines histones et non histones. Ainsi, afin d'identifier les gènes régulés par HDAC1 et HDAC5 et de déterminer si certains d'entre eux pourraient être impliqués dans le contrôle du processus d'invasion des CEIs par les AIEC, une analyse ARN-seq a été réalisée sur des cellules Caco-2 transfectées avec des siARNs dirigés contre HDAC1 ou HDAC5. L'analyse statistique DeSeq2 a identifié 1955 gènes significativement surexprimés et 2352 gènes significativement sous-exprimés suite au « silencing » de HDAC1 comparativement à la condition contrôle siScr ( $p < 0,01$ ,  $n=3$ ) (**Figure 54A**). Le « knock-down » de HDAC5 a entraîné la surexpression de 1206 gènes et la sous-expression de 1328 gènes comparativement à la condition contrôle siScr ( $p < 0,01$ ,  $n=3$ ) (**Figure 54B**). Nos résultats précédents ont montré que le « silencing » de HDAC1 conduisait à une entrée facilitée des AIEC dans les CEIs, contrairement au « silencing » de HDAC5. Par conséquent, nous émettons l'hypothèse que des gènes dont l'expression est augmentée avec siHDAC1, ou diminuée avec siHDAC5, pourraient favoriser l'invasion des CEIs par les AIEC. Afin d'identifier ces gènes d'intérêt, la liste des gènes surexprimés dans la condition siHDAC1 a été croisée avec celle des gènes réprimés dans la condition siHDAC5 menant à l'identification de 41 gènes candidats communs aux deux listes. Pour affiner cette liste, il faudrait étudier plus précisément la fonction de ces gènes pour n'en sélectionner que certains, afin d'évaluer expérimentalement leur potentielle implication dans le contrôle du processus d'invasion des CEIs par les AIEC. Toutefois, nous avons utilisé une autre approche pour limiter le nombre de gènes candidats. Le croisement des 2 listes a été réalisé une nouvelle fois mais en ne conservant que les gènes surexprimés avec un Log2 fold change supérieur à 0,45 suite au « silencing » de HDAC1 et les gènes sous-exprimés avec siHDAC5 présentant un Log2 fold change inférieur à -0,45. Grâce à cette stratégie, la liste des gènes cibles potentiels a été réduite à 7 gènes seulement (*GCNT1*, *SI*, *C5*, *KDELR3*, *RAB12*, *COL5A2* et *TM7SF2*) (**Figure 54C-D**).

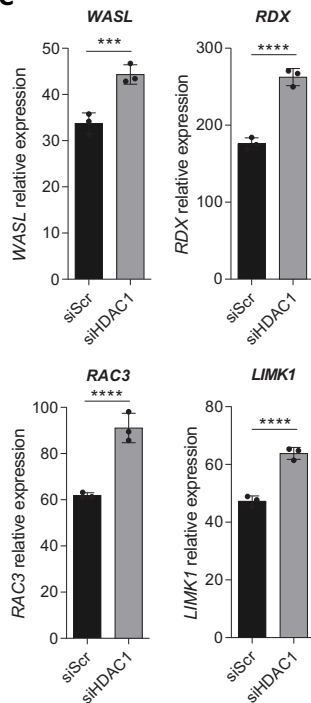
**A**

		Pathway	Analysis	Enrichment ratio	P-value
All genes	Up-regulated genes	Regulation of actin cytoskeleton	KEGG	1.9214	9.0.10 <sup>-5</sup>
Log2 fold change above 0.5	Up-regulated genes	Cytokine-mediated signaling pathway	GO Biological process	2.6004	5.2.10 <sup>-7</sup>
		TNF signaling pathway	KEGG	4.8849	3.5.10 <sup>-5</sup>
		Cytokine-cytokine receptor interaction	KEGG	3.2898	7.6.10 <sup>-6</sup>
Log2 fold change below -0.5	Down-regulated genes	Cholesterol metabolism	KEGG	13.236	7.8.10 <sup>-7</sup>

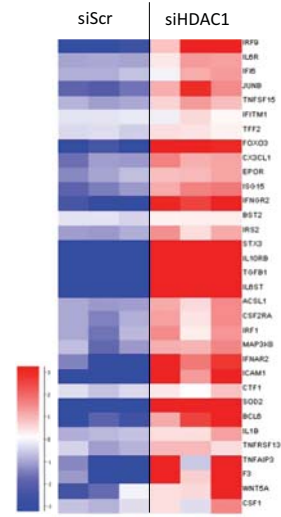
**B Regulation of actin cytoskeleton**



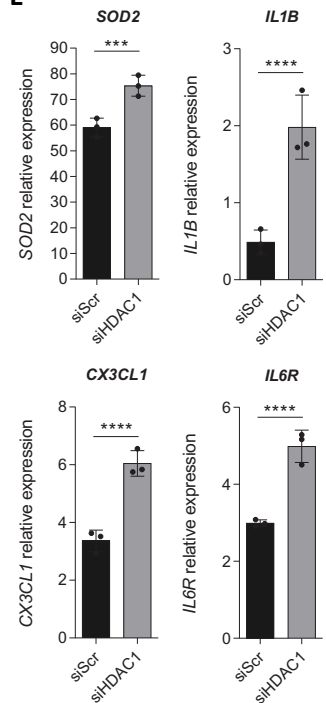
**C**



**D Cytokine-mediated signaling pathway**



**E**



**Figure 55 : Identification des voies régulées par HDAC1.**

**A** : Une étude de « Gene Ontology » (GO) a été réalisée sur les gènes dérégulés suite au silencing de HDAC1 (vs siScr), les principales voies métaboliques dans lesquelles ils sont impliqués sont présentées dans le tableau. **B, D** : Heatmaps représentant le niveau d'expression des gènes impliqués dans la régulation du cytosquelette d'actine et la voie de signalisation contrôlée par les cytokines dans les conditions siScr et siHDAC1. **C, E** : Exemples de gènes impliqués dans les voies identifiées dont l'expression est augmentée suite au silencing de HDAC1. Analyse statistique DeSeq2, \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001. KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, GO : Gene Ontology, Scr : Scramble.

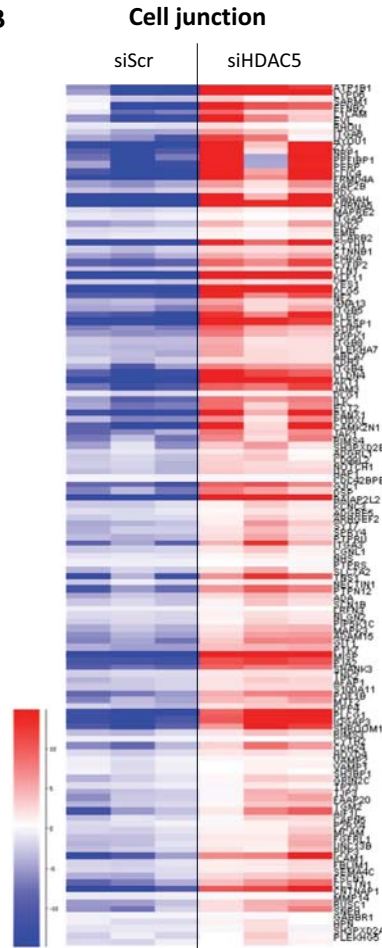
### b. *GCNT1* contrôle le processus d'invasion des CEIs par les AIEC

Afin de déterminer si les gènes candidats sont impliqués dans le processus d'invasion des AIEC, leur expression a été diminuée grâce à la transfection de siARNs. L'efficacité et l'innocuité des siARNs ont été vérifiées pour chaque siARN, à l'exception du siKDELR3, dont l'efficacité n'a pu être validée (données non présentées). Comme précédemment, les cellules ont été infectées 48h après transfection et la capacité d'invasion de la souche AIEC LF82 a été évaluée. Significativement moins de bactéries ont envahi les cellules silencées pour *GCNT1* comparativement à la condition contrôle siScr (siScr : 100% vs mean siGCNT1 : 54.9%, \* $p < 0,05$ ) (**Figure 54E**). Ainsi, ces résultats démontrent que *GCNT1* favorise l'entrée des bactéries AIEC au sein des cellules hôtes, ce gène codant pour la glucosaminyl (N-acétyl) transférase 1, une enzyme impliquée dans la synthèse de la ramification core 2 des O-glycanes. Pour confirmer ce résultat, la relation entre le niveau d'expression de *GCNT1* et la colonisation intestinale par les Entérobactéries chez les patients de la cohorte REMIND a été étudiée. Nous n'avons pas noté de différence de colonisation par les Entérobactéries entre les patients présentant un fort niveau d'expression de *GCNT1* vs ceux présentant un faible niveau d'expression (**Figure 54F**). Concernant l'expression de *GCNT1* en fonction du statut de colonisation, les patients colonisés par les MAEC présentent un plus fort niveau d'expression de *GCNT1* comparativement aux patients non colonisés par les Entérobactéries (médiane Enterobact - : 255,7 vs médiane MAEC + : 294,7, \* $p < 0,05$ ), démontrant que la colonisation par les Entérobactéries est associée avec une plus forte expression de *GCNT1*. Cependant, une plus faible expression de *GCNT1* a été observée chez les patients colonisés par les AIEC comparativement aux patients colonisés par les MAEC (médiane MAEC + : 294,7 vs médiane AIEC + : 216,9, \*\* $p < 0,01$ ) et comparativement aux patients non colonisés par les Entérobactéries même si cette différence n'est pas significative (**Figure 54G**). De plus, aucune corrélation entre le niveau d'expression de *GCNT1* et la quantité d'Entérobactéries associées à la muqueuse iléale des patients n'a été observée (**Figure 54H**). Aux vues des résultats obtenus *in vitro*, il était attendu une corrélation positive entre l'expression de ce gène et la colonisation iléale. Cependant, les échantillons utilisés pour cette analyse provenaient de patients en phase active de la maladie. C'est pourquoi, nous avons réalisé une analyse complémentaire sur des échantillons prélevés 6 mois post-chirurgie. En effet, la résection iléocolique permet d'éliminer les segments trop impactés par la MC, entraînant une « remise à zéro » artificielle de la maladie. En étudiant la récurrence post-opératoire à 6 mois post-chirurgie, cela permet en réalité d'analyser les phases précoces de la MC. Ainsi, une analyse transcriptomique a été réalisée sur des échantillons de muqueuse iléale prélevés à 6 mois post-chirurgie chez des patients ne présentant pas (Score de Rutgeerts i0) ou présentant des formes précoces de lésions iléales (Score de Rutgeerts i1). Le niveau d'expression de *GCNT1* a pu être quantifié dans ces échantillons en fonction du statut de colonisation des patients (**Figure 54I**). Nous avons observé que l'expression de *GCNT1* était plus élevée chez les patients colonisés par les MAEC comparativement aux patients non colonisés par les Entérobactéries (médiane Enterobact - : 278,0 vs médiane MAEC + : 410,9,  $p = 0,0584$ ). Cependant, les

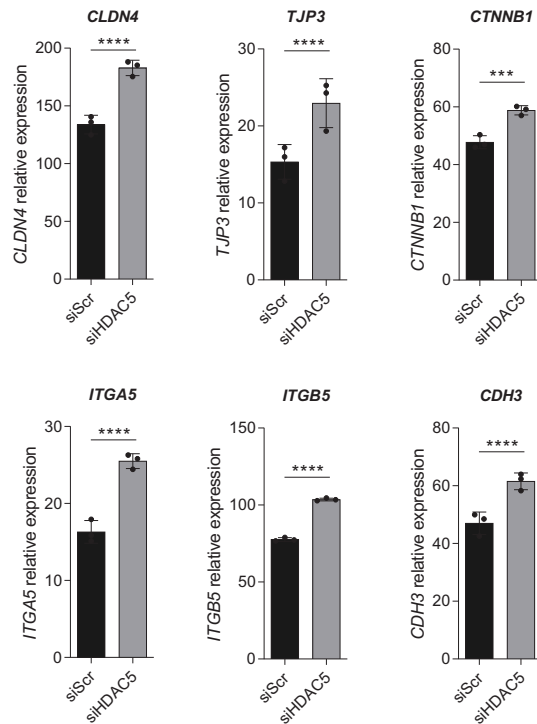
**A**

		Pathway	Analysis	Enrichment ratio	P-value
All genes	Up-regulated genes	Cell junction organization	GO Biological process	2.8175	3.7.10 <sup>-11</sup>
		TGF-β signaling pathway	KEGG	2.7359	4.9.10 <sup>-4</sup>
		Focal adhesion	KEGG	2.0622	4.2.10 <sup>-4</sup>
		Cell junction	GO Cellular component	2.1833	0
All genes	Down-regulated genes	Proteasome	KEGG	5.8238	1.7.10 <sup>-11</sup>

**B**



**C**



**Figure 56 : Identification des voies régulées par HDAC5.**

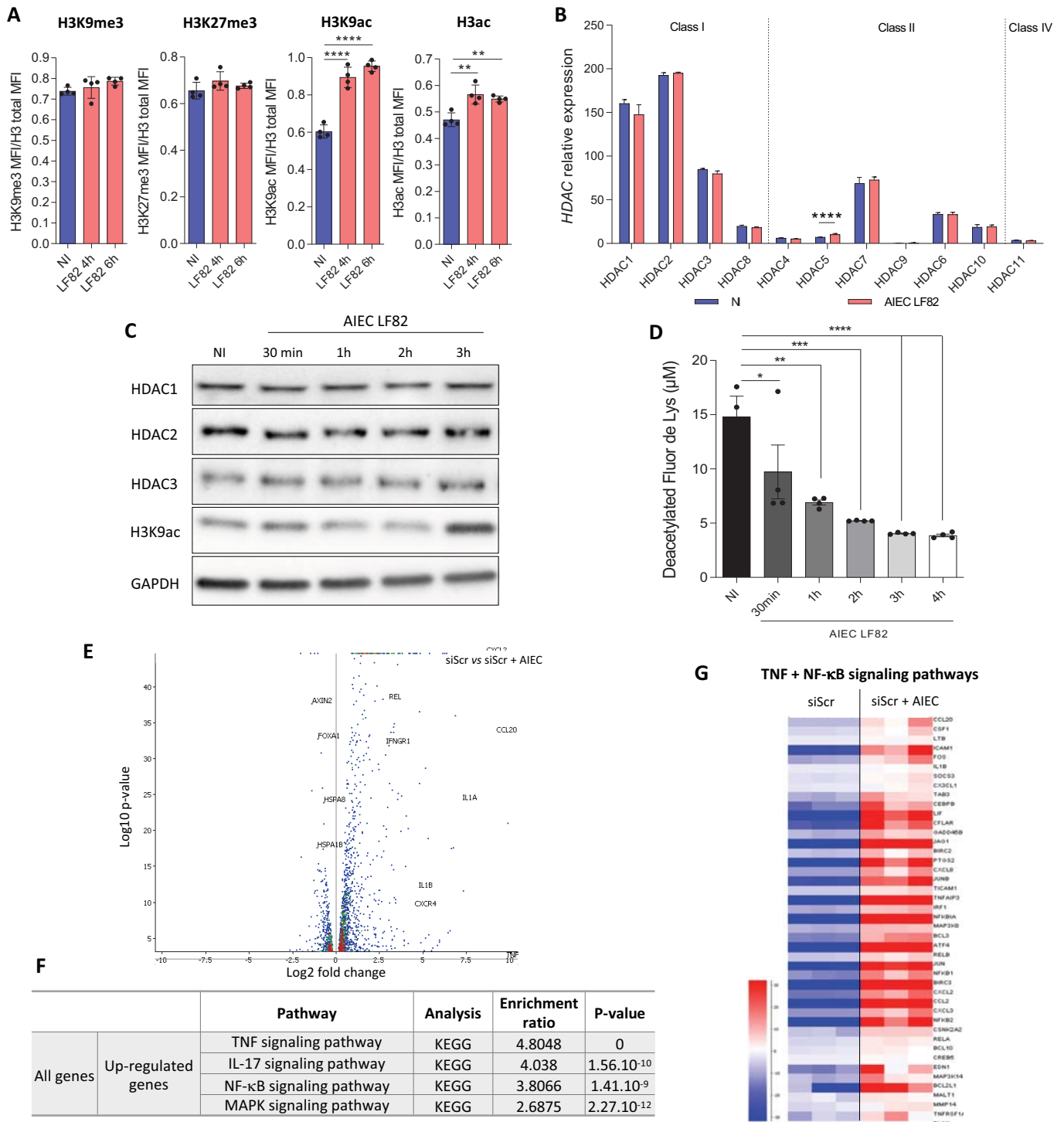
**A** : Une étude de « Gene Ontology » (GO) a été réalisée sur les gènes dérégulés suite au silencing de HDAC5 (vs siScr). Le tableau présente les principales voies métaboliques dans lesquelles les gènes sont impliqués. **B** : Heatmap représentant le niveau d'expression des gènes impliqués dans les jonctions cellulaires dans les conditions siScr et siHDAC5. **C** : Exemples de gènes codant pour des protéines impliquées dans la formation des jonctions serrées ou adhérentes, ou codant pour des protéines d'adhésion cellulaires dont l'expression est augmentée suite au silencing de HDAC5. Analyse statistique DeSeq2, \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001. KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, GO : Gene Ontology, Scr : Scramble.

patients colonisés par des bactéries AIEC ne présentaient de niveau d'expression plus important de *GCNT1* comparativement aux patients non colonisés par des Entérobactéries (donnée non présentée). Ce résultat suggère qu'une plus forte expression de *GCNT1* favoriserait l'implantation des Entérobactéries dans la muqueuse iléale sans spécificité vis-à-vis des AIEC. Pour confirmer les résultats obtenus *in vitro*, des marquages immunohistochimiques pourraient être réalisés sur des échantillons du muqueuse iléale pour déterminer si les patients porteurs d'AIEC présentent un plus fort marquage de *GCNT1*. On pourrait aussi envisager d'inhiber *in vivo* *GCNT1* ou d'utiliser des animaux déficients pour ce gène. Cela permettra de déterminer si *GCNT1* pourrait représenter une cible intéressante pour limiter la colonisation intestinale par les AIEC chez les patients atteints de la MC.

### c. Identification des voies régulées par HDAC1

Une étude de « Gene Ontology » (GO) a été réalisée sur les gènes dérégulés afin d'identifier des voies métaboliques altérées, suite au « silencing » des HDACs d'intérêt, qui pourraient potentiellement expliquer comment HDAC1 et HDAC5 régulent l'entrée des AIEC dans les CEIs. Les gènes dont l'expression est augmentée suite au « silencing » de HDAC1 sont principalement impliqués dans la régulation du cytosquelette d'actine (**Figure 55A-C**). La dérégulation de cette voie suggère que le « silencing » de HDAC1 modifierait la structure de la cellule, la rendant potentiellement plus permissive à l'infection. Il est connu que les AIEC interagissent préférentiellement avec les résidus mannoses exposés sur les cellules en début d'apoptose, ce qui suggère que ces pathobiontes peuvent tirer profit d'une modification de la morphologie des cellules au niveau de l'épithélium pour coloniser (Dumych *et al.*, 2018). Ainsi, il serait intéressant d'étudier la morphologie des cellules Caco-2 transfectées avec un siHDAC1 en réalisant des marquages du cytosquelette d'actine ou des gènes/protéines, tels que *WASL*, *RDX*, *RAC3* ou *LIMK1*, impliqués dans la régulation du cytosquelette afin de confirmer l'implication de HDAC1 dans le contrôle de la structure cellulaire. L'analyse par GO a également mis en évidence un enrichissement en gènes impliqués dans la voie de signalisation contrôlée par les cytokines parmi les gènes surexprimés en condition siHDAC1 (**Figure 55A, D**). Notamment, les gènes *IL1B* et *CX3CL1* codant pour des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires ou encore le gène codant pour le récepteur de l'IL-6 (*IL6R*) voient leur expression induite par le « silencing » de HDAC1 (**Figure 55E**). Ces résultats suggèrent que la baisse d'expression de HDAC1 induirait une inflammation de bas grade et que le rôle de HDAC1 serait de réprimer l'inflammation basale. Pour confirmer ces résultats, il semble important de quantifier des cytokines pro-inflammatoires par ELISA dans le surnageant de cellules transfectées avec siHDAC1 ou mesurer l'expression de gènes pro-inflammatoires par RT-qPCR dans les cellules transfectées.





**Figure 57 : L'infection par les bactéries AIEC diminue l'activité HDAC et induit des gènes de l'inflammation.**

**A** : Analyse par approche Luminex® de différentes modifications post-traductionnelles des histones dans des cellules Caco-2 infectées ou non par la souche AIEC LF82 durant 4h ou 6h. **B** : Une analyse ARN-seq a été réalisée sur les ARNs issus de cellules Caco-2 infectées ou non avec la souche AIEC LF82 durant 3h (n=3). Les niveaux d'expression des différentes HDACs classiques ont été quantifiées dans les cellules Caco-2 infectées ou non (siScr vs siScr + AIEC). Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne ± écart-type. Analyse statistique DeSeq2, \*\*\*\*p<0,0001. **C** : Western blot ciblant l'expression protéique de HDAC1, HDAC2 et HDAC3 et la marque H3K9ac dans les cellules infectées avec la souche AIEC LF82 durant différents temps (n=1). **D** : L'activité HDAC globale des cellules Caco-2 infectées avec la souche AIEC LF82 a été mesurée (n= 4 réplicats techniques). Les résultats sont sous la forme moyenne ± erreur standard à la moyenne. ANOVA à un facteur, corrigée avec un test de Dunnett pour les comparaisons multiples, \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001. **E** : Volcano plot représentant les gènes significativement dérégulés suite à l'infection avec la souche AIEC LF82 comparativement à la condition contrôle siScr (analyse statistique DeSeq2, p<0,01). **F** : Principales voies métaboliques impactées par l'infection, identifiées grâce à une analyse de « Gene Ontology » sur les gènes dérégulés. **G** : Heatmap représentant le niveau d'expression des gènes impliqués dans les voies de signalisation du TNF et de NF-κB dans les conditions siScr et siScr + AIEC.

KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, MFI : Mean Fluorescence Intensity, NI : non infecté, Scr : Scramble.

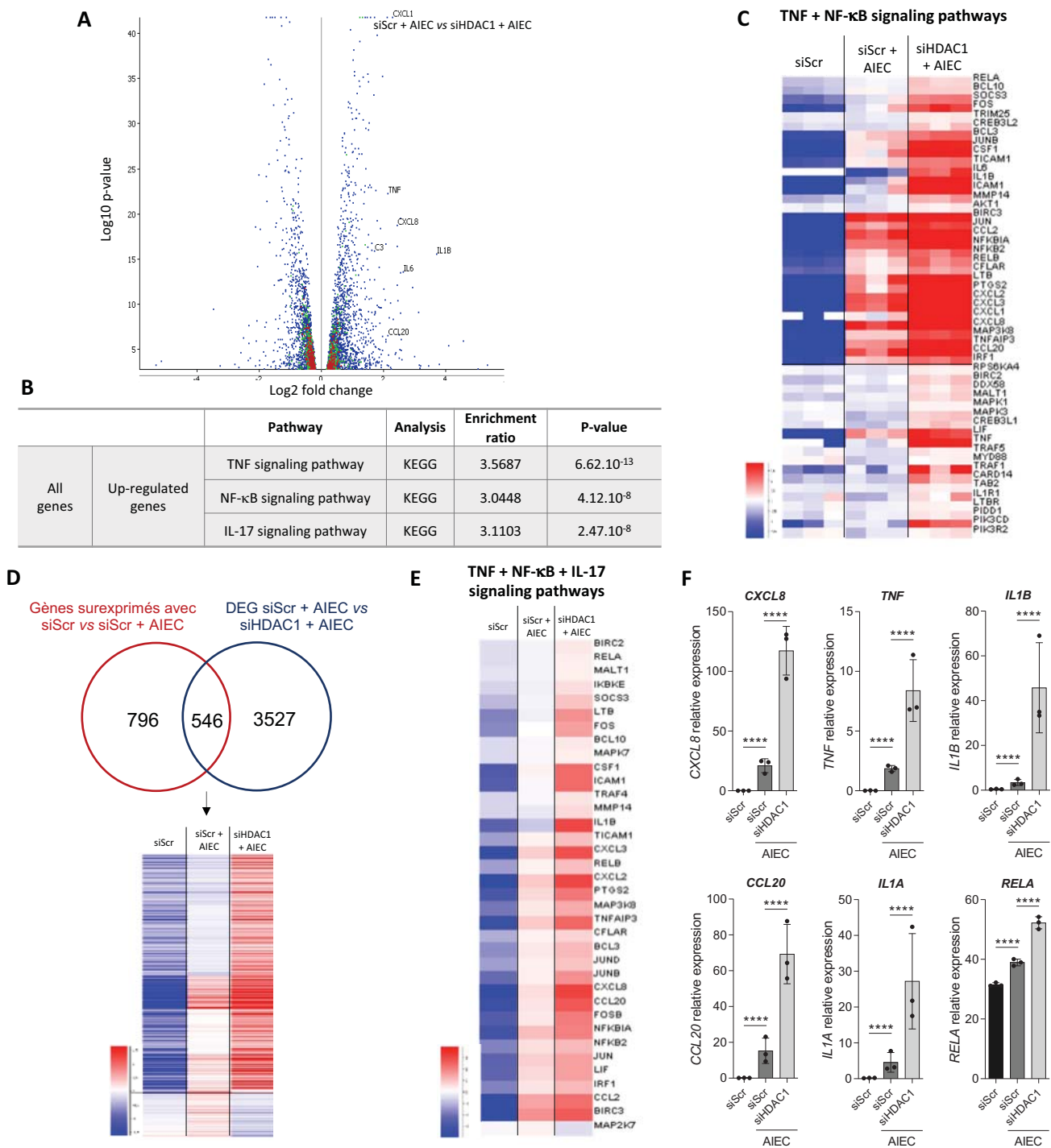
#### d. Identification des voies régulées par HDAC5

De la même manière, une analyse par GO a été réalisée sur les gènes dérégulés suite au « silencing » de HDAC5, permettant notamment d'identifier que les gènes surexprimés dans cette condition étaient majoritairement impliqués dans des voies contrôlant les jonctions cellulaires (**Figure 56A, B**). Parmi les gènes dont l'expression est induite, on retrouve des gènes impliqués dans la formation des jonctions serrées (*CLDN4, TJP3*) ou adhérentes (*CTNNB1*), ou codant pour des protéines d'adhésion cellulaire (*ITGA5, ITGB5, CDH3*) (**Figure 56C**). La surexpression des gènes de cette voie suggère que les jonctions entre cellules seraient renforcées avec le « silencing » de HDAC5, ce qui, en cas d'infection, limiterait l'interaction des AIEC avec les CEIs et expliquerait la diminution de l'entrée des bactéries dans les cellules transfectées avec siHDAC5. Des études futures viseront à valider le rôle de HDAC5 dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire.

## 2. Étude de l'épigénome et du rôle des HDACs d'intérêt en contexte infectieux

### a. Effet de l'infection par les bactéries AIEC sur les marques épigénétiques

Les résultats obtenus précédemment ont montré que les bactéries AIEC étaient capables de moduler l'épigénome des souris, seulement lorsque ces dernières étaient soumises à un régime HF, afin de promouvoir leur colonisation intestinale. Ainsi, nous avons voulu étudier l'effet de l'infection par les bactéries AIEC sur les marques épigénétiques dans les CEIs *in vitro*. Pour cela, plusieurs modifications post-traductionnelles des histones ont été analysées grâce à une approche Luminex® dans des cellules Caco-2 infectées avec la souche AIEC LF82 durant 4h ou 6h. Aucune modification des marques de méthylation n'a été observée suite à l'infection tandis qu'une augmentation de l'acétylation du résidu H3K9 et de l'acétylation globale de l'histone H3 a été démontrée à 4h et 6h post-infection comparativement à la condition non infectée (**Figure 57A**). L'analyse transcriptomique a également été réalisée sur les ARNm des cellules Caco-2 infectées avec la souche AIEC LF82, permettant d'étudier le niveau d'expression des différentes HDACs dans les cellules infectées ou non. Aucune différence significative d'expression pour les différentes HDACs n'a été observée entre les conditions non infectée et infectée, à l'exception de HDAC5 qui voit son expression être induite suite à l'infection avec la souche AIEC LF82 (moyenne HDAC5 :  $7,21 \pm 0,15$  vs moyenne HDAC + AIEC :  $10,22 \pm 1,17$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) (**Figure 57B**). Ces résultats montrent que les bactéries AIEC sont capables d'induire l'expression de HDAC5, condition que nous avons identifiée comme favorisant la colonisation intestinale par les AIEC. Nous avons également observé que les HDAC1, 2 et 3 sont les plus exprimées dans les cellules Caco-2. Afin de déterminer si l'infection pouvait impacter l'expression protéique de ces HDACs, leur accumulation a été étudiée dans des cellules Caco-2 infectées durant différents temps par western blot. Aucune variation de l'accumulation des 3 HDACs n'a été observée suite à l'infection (**Figure 57C**). Cependant, une augmentation de l'acétylation de H3K9 a été observée à 3h post-infection comparativement à la condition non infectée confirmant les résultats obtenus avec l'analyse par



**Figure 58 : HDAC1 limite la réponse inflammatoire induite par l'infection par les bactéries AIEC.**

Une analyse ARN-seq a été réalisée sur les ARNs extraits de cellules Caco-2 infectées avec la souche AIEC LF82 et transfectées avec des siARN-Scr et siARN-HDAC1 (n=3). **A** : Volcano plot représentant les gènes significativement dérégulés suite au silencing de HDAC1 en condition d'infection comparativement à la condition siScr + AIEC (analyse statistique DeSeq2,  $p < 0,01$ ). **B** : Une étude de « Gene Ontology » a été réalisée sur les gènes dérégulés suite au silencing de HDAC1 en condition d'infection (vs siScr + AIEC), le tableau présente les principales voies métaboliques dans lesquelles les gènes sont impliqués. **C** : Heatmap représentant le niveau d'expression des gènes impliqués dans les voies de signalisation du TNF et de NF-κB dans les conditions siScr, siScr + AIEC et siHDAC1 + AIEC. **D** : Diagramme de Venn et heatmap représentant le nombre de gènes surexprimés suite à l'infection et dérégulés suite au silencing de HDAC1 en condition d'infection. **E** : Heatmap représentant le niveau d'expression des gènes induits par l'infection et régulés par HDAC1 impliqués dans les voies de signalisation du TNF, de NF-κB et de l'IL-17. **F** : Exemples de gènes codant pour des cytokines ou des médiateurs pro-inflammatoires dont l'expression, induite par l'infection, est potentialisée suite au silencing de HDAC1. Analyse statistique DeSeq2, \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

DEG : Gènes différenciellement exprimés, KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Scr : Scramble.

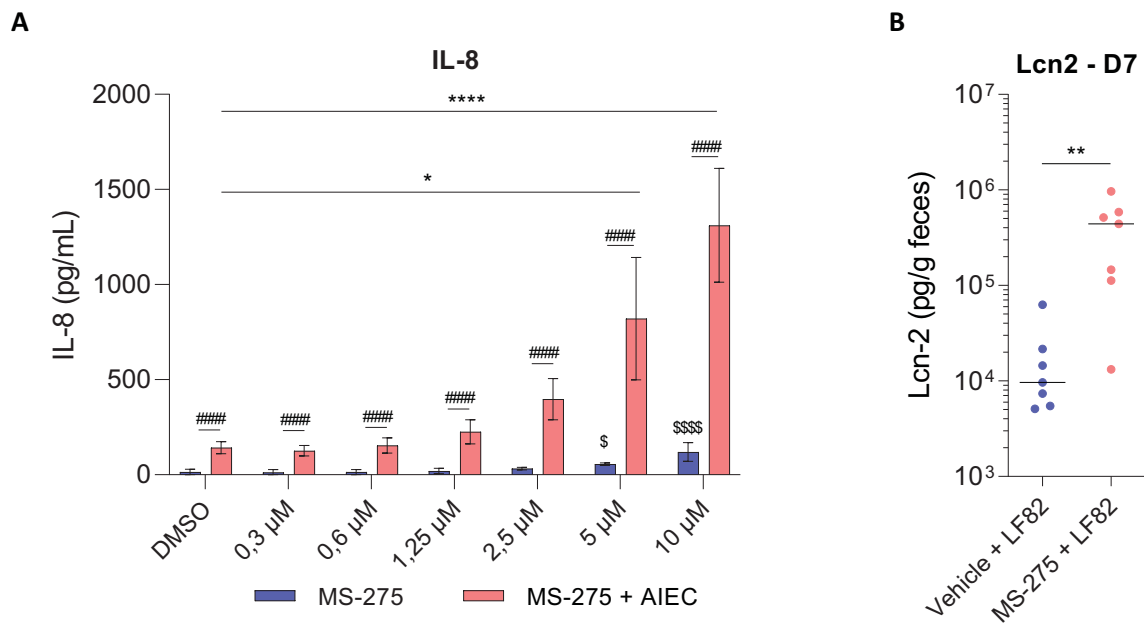
approche Luminex® (**Figure 57C**). Afin de caractériser si l'hyperacétylation de H3K9 induite par l'infection était liée à une altération de l'activité des HDACs, celle-ci a été évaluée dans les cellules Caco-2 infectées avec la souche AIEC LF82 durant différents temps. Une diminution significative de l'activité enzymatique a été observée dans les cellules dès 30 min d'infection comparativement à la condition contrôle non infectée (NI :  $14,80 \pm 1,91 \mu\text{M}$  vs 30 min :  $9,73 \pm 2,49 \mu\text{M}$ , \* $p < 0,05$ ), cette diminution s'accroissant fortement au cours de l'infection, l'inhibition étant maximale à 4h post-infection (NI :  $14,80 \pm 1,91 \mu\text{M}$  vs 4h :  $3,86 \pm 0,13 \mu\text{M}$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) (**Figure 57D**). Ainsi l'infection par les bactéries AIEC *in vitro* induit une nette diminution de l'activité HDAC globale qui expliquerait l'augmentation d'acétylation précédemment mise en évidence ainsi que l'hyperacétylation de H3 observée chez les souris sous régime HF et infectées par les bactéries AIEC.

### **b. Effet de l'infection par les bactéries AIEC sur l'expression des gènes**

Au niveau transcriptomique, l'analyse DeSeq2 a identifié 1342 gènes (3,5 % des gènes) significativement surexprimés et 445 gènes (1,2 % des gènes) significativement réprimés ( $p < 0,01$ ,  $n=3$ ) suite à l'infection des cellules par les bactéries AIEC (**Figure 57E**). Nous avons observé, grâce à l'analyse par GO, que les gènes impliqués dans les voies de signalisation du TNF et de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  sont significativement surexprimés en condition d'infection (**Figure 57F-G**). Ces voies étant impliquées dans la réponse pro-inflammatoire, leur activation en réaction à l'infection semble donc être une réponse logique de la cellule hôte.

### **c. Rôle de HDAC1 en condition d'infection**

Les ARNm des cellules Caco-2 transfectées avec siHDAC1 et siHDAC5 et infectées avec la souche AIEC LF82 ont été séquencés afin de déterminer le rôle de HDAC1 et HDAC5 lors de l'infection. Tout d'abord, l'analyse DeSeq2 a révélé, qu'en contexte d'infection, 2009 gènes étaient significativement surexprimés tandis que 2064 gènes étaient significativement sous-exprimés lorsque HDAC1 était réprimé ( $p < 0,01$ ,  $n=3$ ) (**Figure 58A**). Les gènes particulièrement induits dans la condition siScr + AIEC vs siHDAC1 + AIEC appartiennent comme précédemment aux voies de signalisation du TNF et de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , des voies de l'inflammation (**Figure 58B-C**). Sur la « heatmap » illustrant le niveau d'expression des gènes dérégulés appartenant à ces voies, 2 « clusters » de gènes se distinguent. Concernant le « cluster » du haut, les gènes des voies de l'inflammation dont l'expression est induite par l'infection (comparaison conditions siScr vs siScr + AIEC) sont encore plus surexprimés lorsque HDAC1 est silencé (comparaison conditions siScr + AIEC vs siHDAC1 + AIEC). Sur le « cluster » du bas, les gènes ne semblent pas activés par l'infection (comparaison conditions siScr vs siScr + AIEC) mais sont induits dans les cellules infectées et silencées pour HDAC1 (comparaison conditions siScr + AIEC vs siHDAC1 + AIEC) (**Figure 58C**). Ces résultats suggèrent que HDAC1 limiterait la réponse inflammatoire en contexte infectieux et réprimerait aussi d'autres gènes de l'inflammation non induits



**Figure 59 : Les HDACs de classe I limitent la réponse inflammatoire induite par l'infection par les bactéries AIEC.**

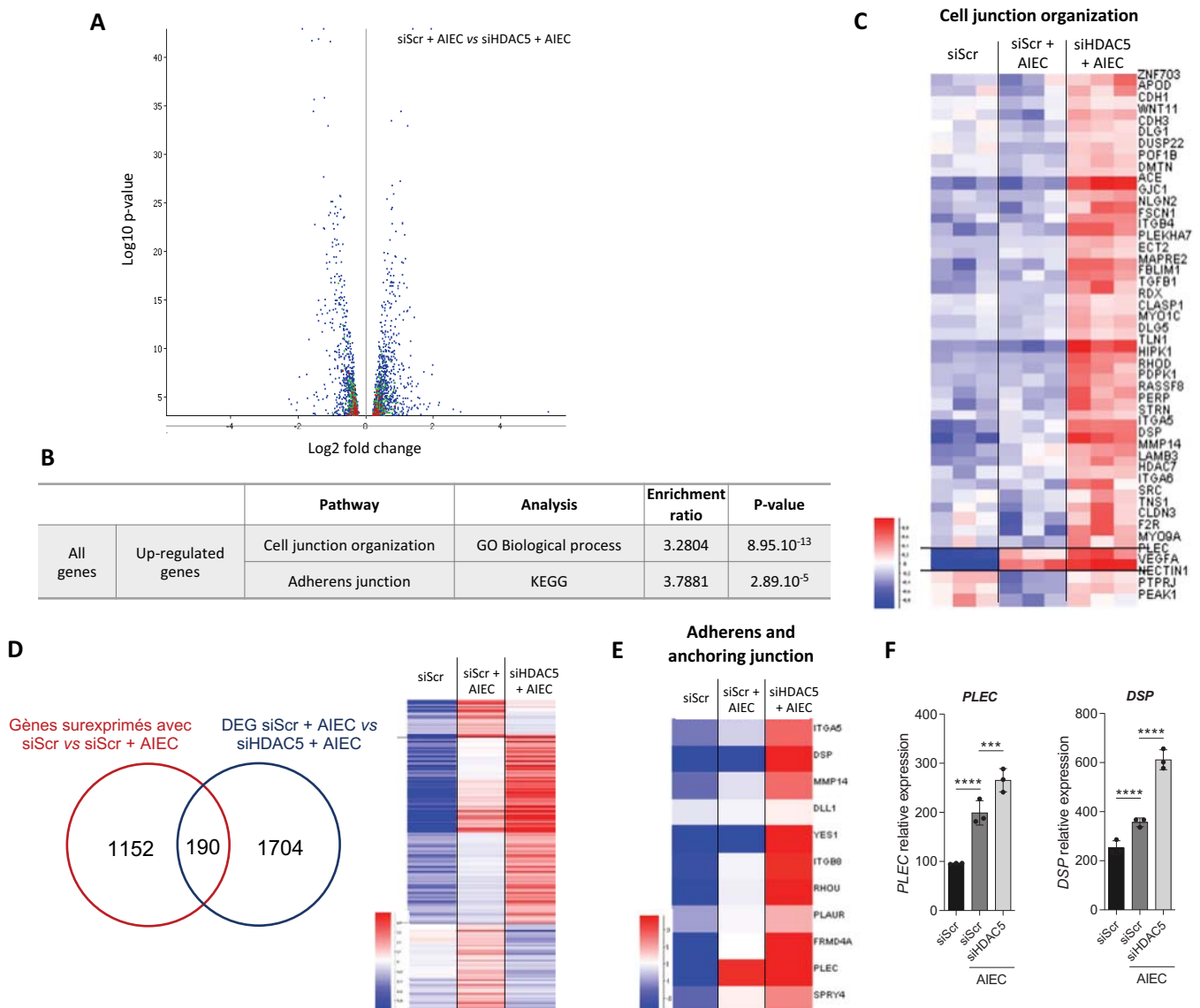
**A** : Les cellules T84 ont été traitées durant 24h avec le MS-275 à des doses croissantes avant d'être infectées ou non avec la souche AIEC LF82 à une MOI de 100. Après 3h d'infection, le surnageant des cellules a été récupéré afin de réaliser un dosage de l'IL-8 par ELISA. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± écart-type. ANOVA à 2 facteurs, corrigé avec un test de Tukey pour les comparaisons multiples \$p<0,05 ; \$\$\$p<0,0001 (comparativement à la condition DMSO non infectée), \*p<0,05 ; \*\*\*\*p<0,0001 (comparativement à la condition DMSO infectée), #####p<0,0001 (cellules non infectées vs infectées). **B** : Le marqueur de l'inflammation intestinale Lcn2 a été dosé par ELISA dans le surnageant des fèces des souris traitées ou non avec le MS-275 et infectées avec la souche AIEC LF82, à jour 7 post-infection (D7). Les résultats sont présentés sous la forme médiane. Test de Mann-Whitney, \*\*p<0,01.

par l'infection. La perte de HDAC1 pourrait conduire à une réponse inflammatoire aberrante en contexte infectieux.

Parmi les gènes induits par l'infection, nous avons cherché à identifier ceux qui sont contrôlés par HDAC1. Pour cela, l'expression de ces gènes en absence de HDAC1 a été étudiée. En croisant la liste des gènes induits par l'infection (condition siScr vs siScr + AIEC) avec celle des gènes dérégulés par le « silencing » de HDAC1 en contexte d'infection (condition siScr + AIEC vs siHDAC1 + AIEC), nous avons identifié 546 gènes dont l'expression est activée par l'exposition aux bactéries AIEC mais est également contrôlée par HDAC1, ce qui représente 41% des gènes significativement surexprimés suite à l'infection (**Figure 58D**). Une analyse par GO a une nouvelle fois révélé que ces gènes étaient majoritairement impliqués dans les voies de signalisation du TNF, de l'IL-17 et de NF- $\kappa$ B, comme les gènes *CXCL8*, *TNF*, *IL1B* et *CCL20* codant pour des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, *IL1A* codant pour un médiateur de la réponse immune ou encore *RELA* qui code pour une sous-unité de NF- $\kappa$ B (**Figure 58E-F**). L'expression de ces gènes, induite par l'infection, est encore plus forte en condition de « silencing » ce qui renforce le fait que HDAC1 est central dans le contrôle de la réponse inflammatoire de la cellule en contexte d'infection par les bactéries AIEC.

Afin de valider le rôle de HDAC1 dans le contrôle de la réponse inflammatoire en contexte d'infection par les AIEC, la cytokine pro-inflammatoire IL-8 a été dosée dans le surnageant de culture des cellules T84 traitées avec du MS-275, un inhibiteur des HDACs de classe I, et infectées ou non avec la souche AIEC LF82. Dans les cellules non infectées, la sécrétion d'IL-8 est induite suite au traitement avec les plus fortes doses d'inhibiteurs (moyenne DMSO :  $13,43 \pm 15,62$  pg/mL vs moyenne 5  $\mu$ M :  $56,25 \pm 6,85$  pg/mL et moyenne 10  $\mu$ M :  $119,83 \pm 49,63$  pg/mL,  $p < 0,05$ ,  $****p < 0,0001$ ) (**Figure 59A**). Cela confirme les résultats précédents où il a été observé que le « silencing » de HDAC1 induisait l'expression de gènes de l'inflammation en absence d'infection (**Figure 55D-E**). Pour chaque condition, la sécrétion d'IL-8 était plus forte lorsque les cellules étaient infectées avec la souche AIEC LF82 comparativement à la condition non infectée, confirmant que l'infection avec les bactéries AIEC induit une réponse pro-inflammatoire (**Figure 57F-G** et **Figure 59A**). De manière intéressante, nous avons observé que l'inhibition des HDACs de classe I avec les plus fortes doses menait à une production incontrôlée de l'IL-8 en condition d'infection (moyenne DMSO + AIEC :  $142,68 \pm 31,86$  pg/mL vs 5  $\mu$ M + AIEC :  $821,12 \pm 321,98$  pg/mL et 10  $\mu$ M + AIEC :  $1311,56 \pm 298,76$  pg/mL,  $*p < 0,05$ ,  $****p < 0,0001$ ). Aussi, significativement plus de Lcn2, un marqueur d'inflammation intestinale, a été quantifiée dans les fèces des souris traitées avec le MS-275 et infectées avec la souche AIEC LF82 à 7 jours post-infection comparativement aux souris non traitées (**Figure 59B**). Ces résultats sont concordants avec ce qui a été observé lors de l'analyse transcriptomique, confirmant que HDAC1 aurait un rôle anti-inflammatoire, et limiterait l'inflammation induite par l'infection bactérienne.





**Figure 60 : La déficience pour HDAC5 induit l'expression de gènes impliqués dans la constitution des jonctions cellulaires dans les cellules infectées par les AIEC.**

Une analyse ARN-seq a été réalisée sur les ARNs issus de cellules Caco-2 infectées avec la souche AIEC LF82 et transfectées avec des siARN-Scr et siARN-HDAC5 (n=3). **A** : Volcano plot représentant les gènes significativement dérégulés suite au silencing de HDAC5 en condition d'infection comparativement à la condition siScr + AIEC (analyse statistique DeSeq2,  $p < 0,01$ ). **B** : Une étude de « Gene Ontology » (GO) a été réalisée sur les gènes dérégulés suite au silencing de HDAC5 en condition d'infection (vs siScr + AIEC), le tableau présente les principales voies métaboliques dans lesquelles les gènes sont impliqués. **C** : Heatmap représentant le niveau d'expression des gènes impliqués dans l'organisation des jonctions cellulaires dans les conditions siScr, siScr + AIEC et siHDAC5 + AIEC. **D** : Diagramme de Venn et heatmap représentant le nombre de gènes surexprimés suite à l'infection et dérégulés suite au silencing de HDAC5 en condition d'infection. **E** : Heatmap représentant le niveau d'expression des gènes induits par l'infection et régulés par HDAC5 impliqués dans les jonctions adhérentes et d'ancrage. **F** : Exemples de gènes codant des constituants des jonctions cellulaires dont l'expression, induite par l'infection, est potentialisée suite au silencing de HDAC5. Analyse statistique DeSeq2, \*\*\* $p < 0,001$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

DEG : Gènes différemment exprimés, KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, GO : Gene Ontology, Scr : Scramble.

#### d. Rôle de HDAC5 en condition d'infection

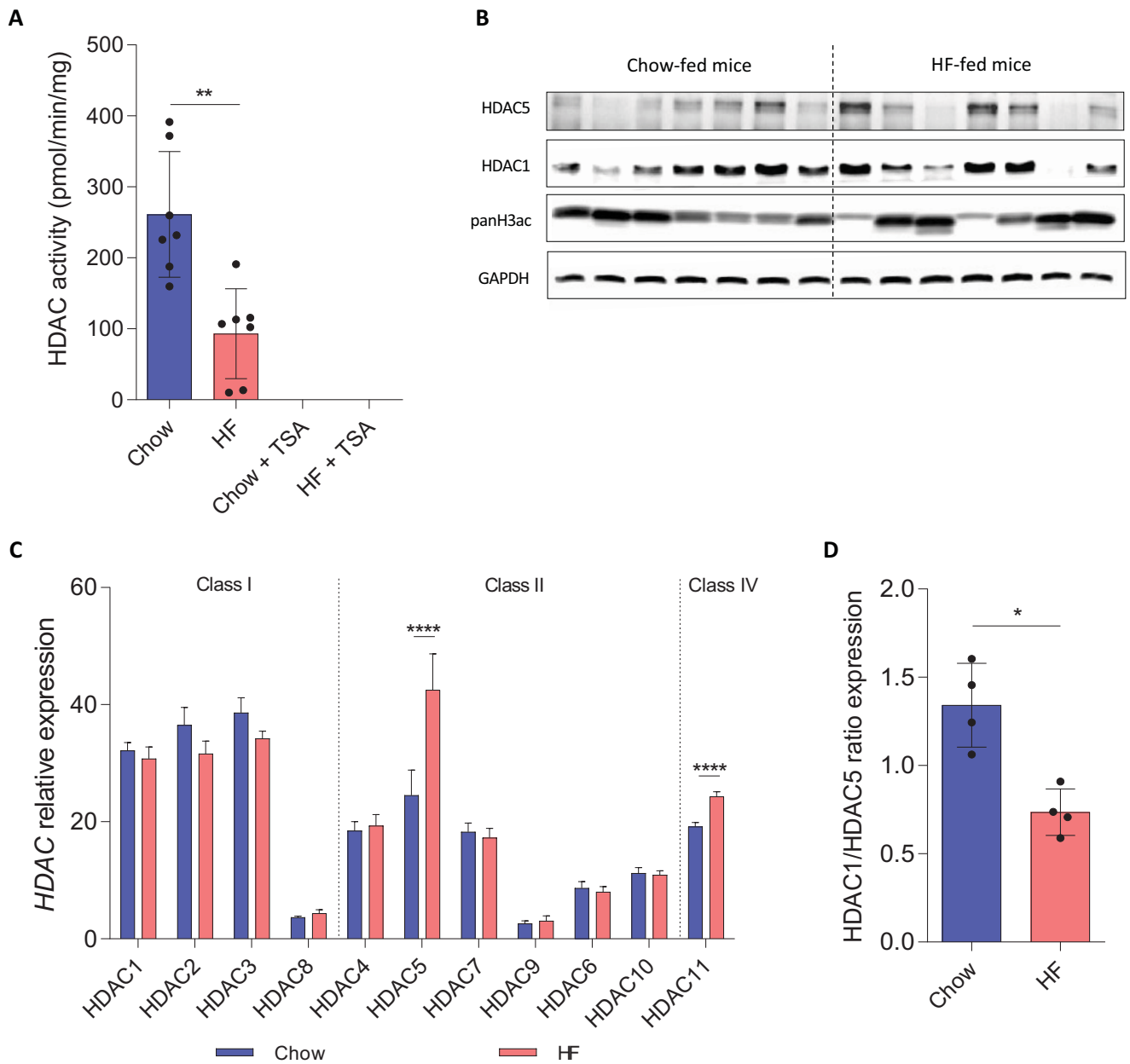
Une stratégie similaire a été mise en place pour identifier le rôle de HDAC5 au cours de l'infection. L'analyse statistique DeSeq2 a permis d'identifier 949 gènes significativement surexprimés et 945 gènes significativement sous-exprimés lorsque l'on compare les conditions siScr + AIEC vs siHDAC5 + AIEC ( $p < 0,01$ ,  $n=3$ ) (**Figure 60A**). En présence de bactéries AIEC, les gènes impliqués dans l'organisation des jonctions cellulaires et dans la formation des jonctions adhérentes étaient particulièrement surexprimés lorsque HDAC5 était silencé (**Figure 60B**). Aussi, nous avons observé que la plupart des gènes impliqués dans l'organisation des jonctions cellulaires ne sont pas induits par l'infection seule, mais uniquement par le « silencing » de HDAC5 en condition d'infection, ce qui pourrait expliquer l'entrée limitée des AIEC dans les cellules silencées pour HDAC5 (**Figure 60C**).

Comme précédemment, la liste des gènes surexprimés suite à l'infection a été croisée avec la liste des gènes dérégulés suite au « silencing » de HDAC5 en condition d'infection menant à l'identification de 190 gènes dont l'expression, activée par la présence des bactéries (14% des gènes), est également contrôlée par HDAC5 (**Figure 60D**). Ces gènes sont impliqués dans la constitution des jonctions adhérentes et d'ancrage, comme *PLEC* ou *DSP* qui codent respectivement pour la plectine et la desmoplakine, ces protéines participant notamment à l'ancrage des filaments intermédiaires du cytosquelette aux desmosomes (**Figure 60E-F**). Ainsi, ces résultats montrent qu'une déficience pour HDAC5 induit l'expression de gènes codant pour des constituants des jonctions cellulaires en condition d'infection ou non. Une augmentation de l'expression de ces gènes renforcerait l'adhésion intercellulaire et expliquerait la diminution de l'entrée des AIEC dans les cellules transfectées avec siHDAC5. Il serait intéressant d'étudier la perméabilité paracellulaire en condition d'infection pour voir si le renforcement des jonctions cellulaires attendu avec siHDAC5 bloque le passage des bactéries et l'invasion cellulaire. Une mesure de la perméabilité intestinale chez des souris traitées avec du LMK-235 et infectées avec la souche AIEC LF82 permettraient également de confirmer les résultats obtenus suite à l'analyse transcriptomique et de pouvoir conclure sur le rôle de HDAC5 sur la barrière épithéliale.

### 3. Effets du régime occidental sur les marques épigénétiques et l'expression des gènes au niveau iléal

#### a. Impact du régime HF sur l'activité HDAC dans l'iléon

Dans un premier temps, l'activité HDAC globale dans l'iléon a été étudiée chez les souris nourries avec un régime conventionnel ou HF durant 4 semaines. Une diminution significative de l'activité HDAC globale a été observée dans l'iléon des souris sous régime HF comparativement aux souris sous régime conventionnel (moyenne iléon Chow : 261,2 pmol/min/mg vs moyenne iléon HF : 093,19 pmol/min/mg,  $^{**}p < 0,01$ ) (**Figure 61A**). Malgré cette baisse d'activité, aucune différence significative concernant le niveau global d'acétylation de H3 n'a été observée dans la muqueuse iléale des souris (**Figure 61B**). Toutefois, cela ne signifie pas que l'acétylation au niveau de gènes spécifiques



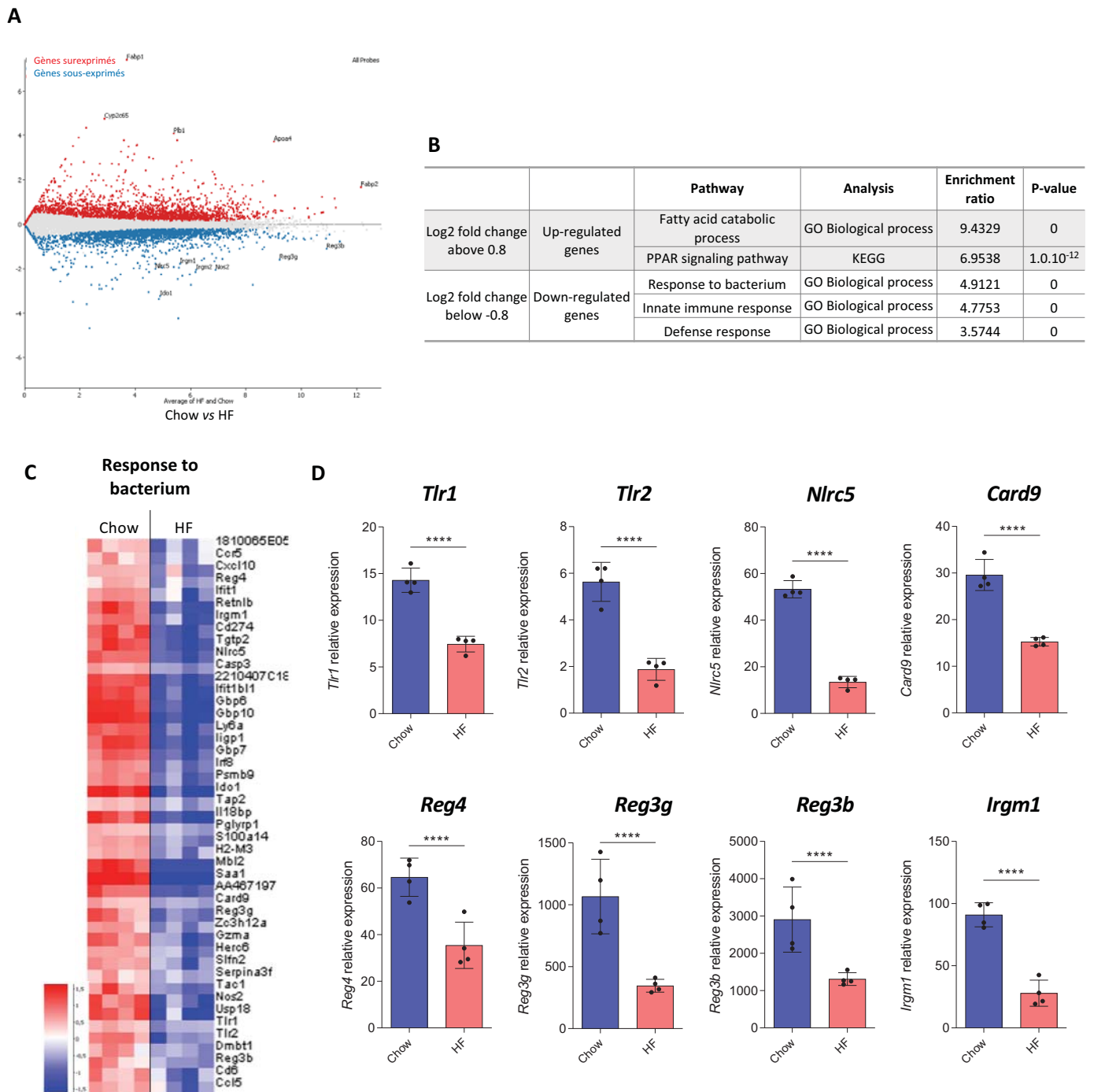
**Figure 61 : Le régime HF inhibe l'activité HDAC et altère le ratio d'expression HDAC1/HDAC5 dans l'iléon.** **A** : L'activité HDAC globale a été mesurée sur des extraits nucléaires de cellules épithéliales intestinales issues de l'iléon de souris soumises durant 4 semaines à un régime conventionnel (Chow) ou enrichi en graisses (HF) (n=7 souris/groupe). La trichostatine A (TSA), un inhibiteur de HDACs, sert de contrôle de spécificité du test. Test de Mann-Whitney, \*\*p<0,01. **B** : Western blot ciblant l'expression protéique de HDAC1, HDAC5 et l'acétylation globale de l'histone H3 (H3ac) dans la muqueuse iléale des souris sous régime conventionnel ou HF (n= 7 souris/groupe). **C** : Une analyse ARN-seq a été réalisée sur des échantillons d'iléons issus de souris soumises à un régime Chow ou HF (n=4 souris/groupe). Quantification des niveaux d'expression des différentes HDACs classiques dans l'iléon des souris des différents groupes. Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type. Analyse statistique DeSeq2, \*\*\*\*p<0,0001. **D** : Ratio de l'expression de HDAC1 par rapport à l'expression de HDAC5 dans les différentes conditions. Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type. Mann-Whitney, \*p<0,05.

n'est pas modifiée. Il serait intéressant de réaliser des expériences de ChIP-seq ciblant des marques d'acétylation spécifiques (comme H3K9ac) ou bien HDAC1 ou 5, pour déterminer quels gènes présentent un enrichissement en marques histones acétylées, ou les gènes sur lesquels se fixent les HDACs d'intérêt, suite à la consommation du régime HF chez les souris. Cela permettrait d'identifier des gènes directement contrôlés par les HDACs et qui pourraient potentiellement être impliqués dans le contrôle de l'entrée des AIEC dans les CEIs.

### **b. Impact du régime HF sur l'expression des gènes dans l'iléon : analyse globale**

Une analyse transcriptomique a été réalisée sur les ARNm extraits de l'iléon des souris soumises au régime conventionnel ou HF. Cela a permis d'étudier les niveaux d'expression des différentes HDACs. Aucune différence significative de l'expression de *HDAC1* n'a été observée entre les groupes Chow vs HF tandis que la consommation d'un régime HF entraîne une augmentation significative de l'expression de *HDAC5* dans l'iléon des souris (moyenne Chow :  $24,55 \pm 4,26$  vs moyenne HF :  $42,54 \pm 6,12$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) (**Figure 61C**). Concernant le ratio HDAC1/HDAC5, il est significativement plus faible dans l'iléon des souris nourries avec le régime HF comparativement aux souris sous régime conventionnel (moyenne Chow :  $1,34 \pm 0,24$  vs moyenne HF :  $0,74 \pm 0,13$ , \* $p < 0,05$ ) (**Figure 61D**). Ces résultats démontrent qu'au niveau iléal, le régime HF est capable de déréguler l'expression de *HDAC5*, entraînant une baisse du ratio HDAC1/HDAC5, conditions que nous avons identifiées comme favorisant la colonisation intestinale par les Entérobactéries et les AIEC. Concernant les autres HDACs, leur expression n'est pas modifiée suite à la consommation d'un régime enrichi en graisses, seule l'expression de *HDAC11* est augmentée de manière significative dans l'iléon des souris HF comparativement aux souris Chow (**Figure 61C**). Il serait intéressant, à plus long terme, d'approfondir l'étude du rôle de HDAC11, notamment dans la colonisation intestinale par les AIEC suite à son inhibition dans des modèles de cellules en culture ou dans des souris déficientes pour HDAC11, mais aussi de déterminer les gènes dérégulés suite à son inhibition.

D'une manière plus globale, l'analyse statistique DeSeq2 a permis d'identifier 2304 gènes significativement surexprimés (6,5 % des gènes) et 2172 gènes significativement sous-exprimés (6,1% des gènes) dans l'iléon des souris sous régime HF comparativement aux souris contrôles ( $p < 0,01$ ,  $n=4$  échantillons/groupe) (**Figure 62A**). Une étude par GO a ensuite été réalisée afin d'identifier les voies cellulaires dérégulées. Nous avons observé que des gènes impliqués dans le catabolisme des lipides et dans la voie de signalisation de PPAR, voie activée par les acides gras, sont significativement surexprimés suite à la consommation du régime HF (**Figure 62B**). Ainsi, l'activation de ces voies semble logique aux vues du régime alimentaire enrichi en graisses administré aux souris. Concernant les gènes dont l'expression est réprimée, nous avons observé un enrichissement de gènes impliqués dans les mécanismes de défense de l'hôte (**Figure 62B-C**). Notamment, les gènes *Tlr1*, *Tlr2*, *Nlrc5* et *Card9*,



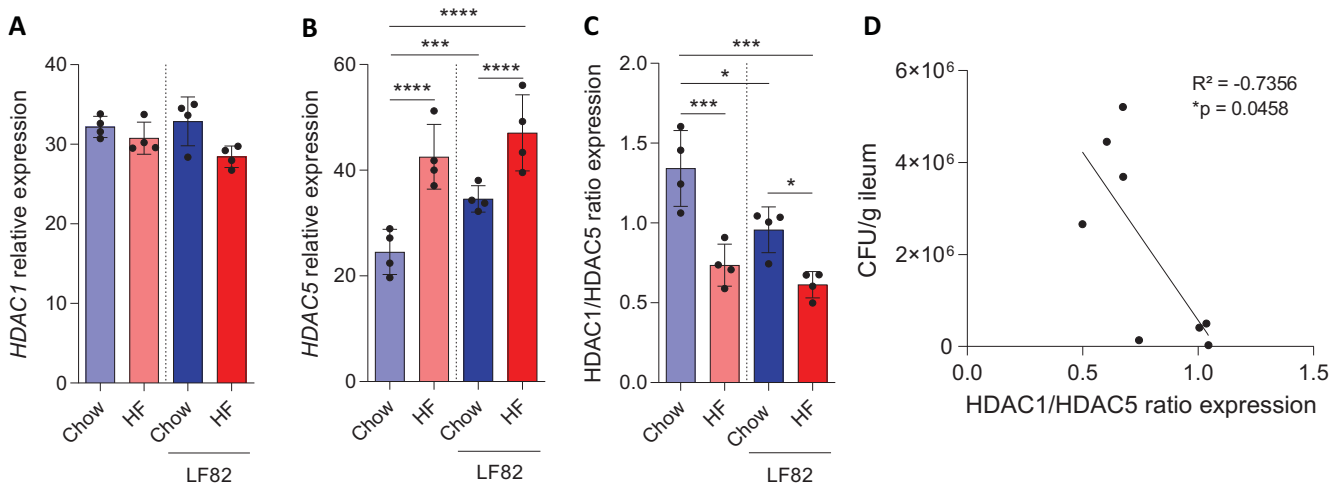
**Figure 62 : Le régime HF inhibe l'expression de gènes impliqués dans la défense de l'hôte au niveau de l'iléon.** Une analyse ARN-seq a été réalisée sur des échantillons d'iléon issus de souris soumises à un régime Chow ou HF durant 4 semaines (n=4 souris/groupe). **A** : MA plot représentant les gènes significativement dérégulés au niveau de l'iléon des souris suite à la consommation d'un régime enrichi en graisses (HF) comparativement aux souris sous régime conventionnel (Chow) (analyse statistique DeSeq2,  $p < 0,01$ ). **B** : Une étude de « Gene Ontology » (GO) a été réalisée sur les gènes dérégulés par le régime HF (vs Chow), les principales voies métaboliques dans lesquelles ils sont impliqués sont présentées dans le tableau. **C** : Heatmap représentant le niveau d'expression des gènes impliqués dans la réponse aux bactéries dans les groupes Chow et HF. **D** : Exemples de gènes impliqués dans la reconnaissance des bactéries, dans l'autophagocytose et codant pour des peptides antimicrobiens dont l'expression est diminuée chez les souris sous régime HF comparativement aux souris contrôles. Analyse statistique DeSeq2, \*\*\*\* $p < 0,0001$ . KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, GO : Gene Ontology.

codant pour des récepteurs de l'immunité innée, voient leur expression fortement diminuée chez les souris sous régime HF comparativement aux souris contrôles. Ces observations ouvrent la voie à des études plus approfondies des voies de signalisation activées par ces TLRs afin de valider leur perte de fonctionnalité en contexte de régime enrichi en graisses. Des gènes codant pour des peptides antimicrobiens ou des gènes impliqués dans le processus autophagique sont également réprimés chez les souris du groupe HF vs Chow (**Figure 62D**). Ces résultats suggèrent que la consommation d'un régime enrichi en graisses pourrait inhiber la reconnaissance et la prise en charge des bactéries facilitant leur implantation et empêchant ainsi leur élimination. Il serait intéressant de déterminer l'effet bactéricide de cryptes intestinales de souris nourries avec et sans régime HF vis-à-vis des AIEC afin de valider, d'un point de vue fonctionnel, l'effet néfaste du régime HF sur le contrôle de la prolifération des bactéries AIEC dans la muqueuse iléale. Toutefois, ces travaux préliminaires ne montrent pas l'éventuelle implication de HDAC1/HDAC5 dans le contrôle de l'expression de ces gènes en condition de régime enrichi. Des souris déficientes pour HDAC1 ou HDAC5 spécifiquement dans les CEIs pourraient être utilisées afin de déterminer si les gènes identifiés sont directement régulés par ces enzymes et si l'effet du régime alimentaire enrichi est toujours observé malgré l'absence de ces HDACs.

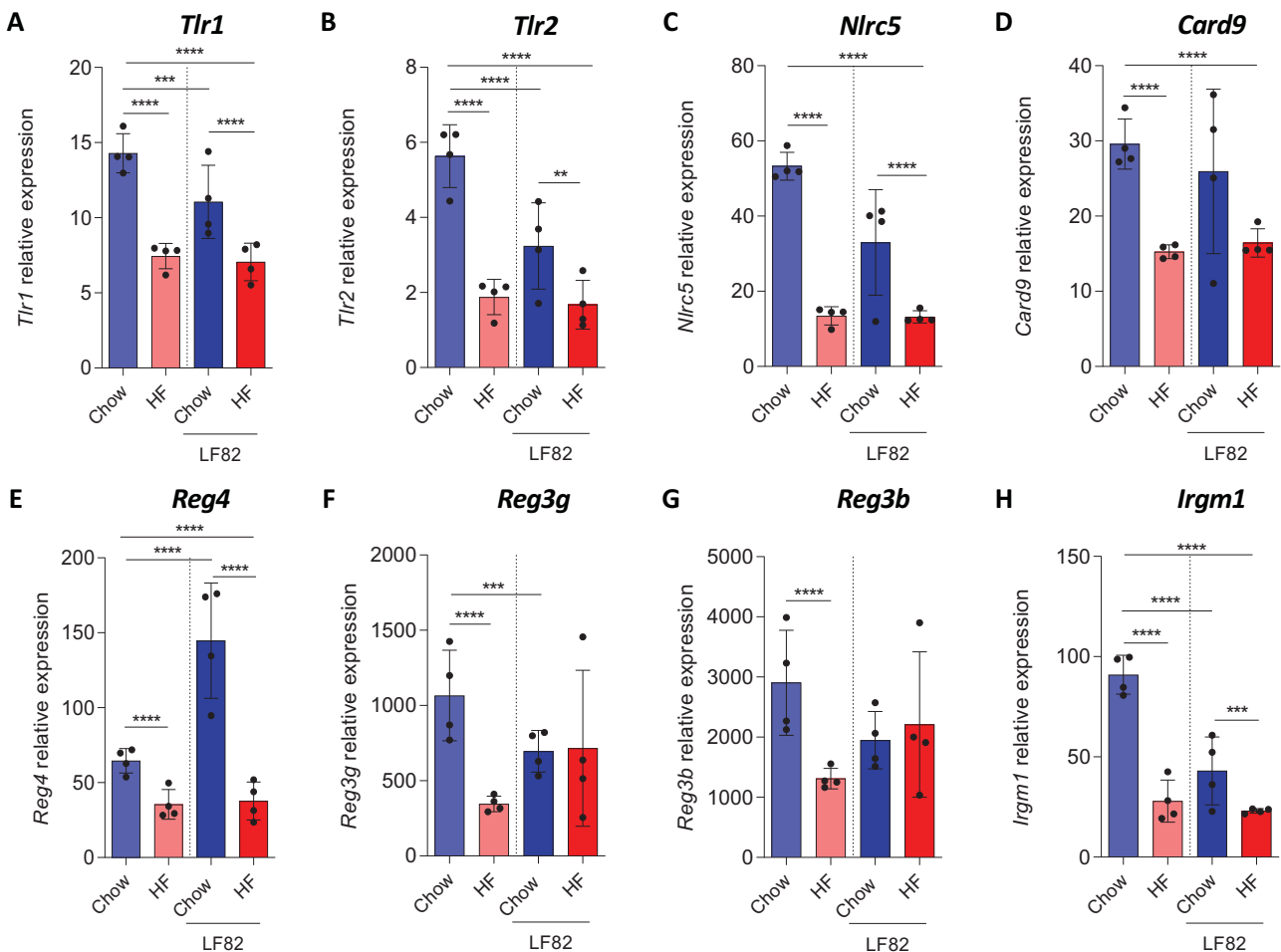
### c. Impact du régime HF et de l'infection par la souche AIEC LF82 sur l'expression des gènes dans l'iléon : analyse globale

En condition d'infection, il a été observé une légère baisse non significative de l'expression de *HDAC1* ainsi qu'une augmentation significative de l'expression de *HDAC5* chez les souris sous régime HF vs Chow (moyenne Chow + LF82 :  $34,60 \pm 2,50$  vs moyenne HF + LF82 :  $47,05 \pm 7,20$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) (**Figure 63A-B**). De plus, l'infection induit une diminution du ratio d'expression HDAC1/HDAC5 en condition Chow (moyenne Chow :  $1,34 \pm 0,24$  vs moyenne Chow + LF82 :  $0,96 \pm 0,14$ , \* $p < 0,05$ ), ce ratio étant encore plus diminué en contexte HF + LF82 (moyenne Chow + LF82 :  $0,96 \pm 0,14$  vs moyenne HF + LF82 :  $0,61 \pm 0,08$ , \* $p < 0,05$ ) (**Figure 63C**). Une corrélation significativement négative a également été observée entre le ratio HDAC1/HDAC5 et la quantité de bactéries AIEC associées à la muqueuse iléale, montrant qu'un faible ratio HDAC1/HDAC5 est associé à une colonisation intestinale par les AIEC augmentée. Ceci suggère également que ce ratio pourrait être prédictif de la colonisation iléale par les AIEC (**Figure 63D**). Aussi, l'infection seule par les bactéries AIEC induisait une augmentation de l'expression de *HDAC5* (moyenne Chow :  $24,55 \pm 4,26$  vs moyenne Chow + LF82 :  $34,60 \pm 2,50$ , \*\*\* $p < 0,001$ ) ainsi qu'une diminution du ratio HDAC1/HDAC5 (**Figure 63B-C**). Au contraire, aucune modification de l'expression de *HDAC5* ou du ratio n'est observée entre les conditions HF et HF + AIEC LF82 (**Figure 63B-C**). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le régime alimentaire enrichi a déjà profondément altéré ce ratio et que l'infection n'aggrave pas ce déséquilibre.





**Figure 63 : L'infection par les AIEC entraîne une diminution du ratio HDAC1/HDAC5, comme le régime HF.** L'analyse ARN-seq a également été réalisée sur des échantillons d'iléon issus de souris soumises à un régime conventionnel (Chow) ou enrichi en graisses (HF) et infectées avec la souche AIEC LF82 (n=4 souris/groupe). **A-B** : Quantification des niveaux d'expression de HDAC1 (**A**) et HDAC5 (**B**) dans l'iléon des souris des différents groupes. Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type. Analyse statistique DeSeq2, \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001. **C** : Ratio de l'expression de HDAC1 par rapport à l'expression de HDAC5 dans les différentes conditions. Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type. ANOVA à un facteur, corrigé avec un test de Tukey pour les comparaisons multiples, \*p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001. **D** : Corrélation entre le ratio d'expression HDAC1/HDAC5 et la quantité de bactéries AIEC LF82 associées à la muqueuse iléale des souris infectées, sous régime conventionnel et enrichi en graisses (n= 4 Chow + 4 HF). La corrélation existant entre 2 variables est évaluée par un test de Spearman. CFU : Colony Forming Unit.



**Figure 64 : Étude de l'effet combiné du HF et de l'infection sur l'expression des gènes impliqués dans la réponse à l'infection bactérienne.** L'analyse ARN-seq a également été réalisée sur des échantillons d'iléon issus de souris soumises à un régime conventionnel (Chow) ou enrichi en graisses (HF) et infectées avec la souche AIEC LF82 (n=4 souris/groupe). **A-H** : Quantification des niveaux d'expression des gènes impliqués dans la défense de l'hôte identifiés précédemment dans les différentes conditions. Analyse statistique DeSeq2, \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001.

Concernant les gènes impliqués dans la défense de l'hôte présentés précédemment, en condition d'infection, une baisse significative de l'expression de la plupart des gènes a été observée chez les souris sous régime HF vs Chow (condition Chow + LF82 vs HF + LF82). De plus, l'infection seule entraîne une baisse de leur expression, bien que cette diminution ne soit pas significative pour chaque gène (condition Chow vs Chow + LF82) (**Figure 64A-G**). Comme précédemment, il n'y a pas de différence d'expression de ces gènes lorsque l'on compare les conditions HF vs HF + AIEC LF82. Ces résultats suggèrent que l'infection et le régime impacteraient de manière similaire l'expression de *HDAC5* et des gènes impliqués dans la défense de l'hôte, mais sans effet cumulatif. De plus, l'effet du régime HF semble plus important que l'effet de l'infection seule. Toutefois, concernant le gène *Reg4*, il a été observé une augmentation significative de son expression suite à l'infection des souris contrôles comparativement aux souris contrôles non infectées (moyenne Chow :  $64,60 \pm 8,20$  vs moyenne Chow + LF82 :  $144,80 \pm 38,50$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Ceci pourrait représenter un mécanisme de défense de l'hôte en condition d'infection. Cependant, cette induction due à l'infection est totalement perdue lorsque les animaux sont nourris avec un régime enrichi, ce qui pourrait expliquer l'implantation facilitée des AIEC dans la muqueuse des animaux sous régime occidental (**Figure 64E**).

Pour conclure, cette première étude ainsi que les résultats complémentaires présentés ici ont permis de révéler le rôle clé de HDAC1 et HDAC5 dans la colonisation intestinale par les Entérobactéries et les AIEC. Nous avons également mis en évidence le rôle de HDAC1 dans le contrôle de la réponse inflammatoire ainsi que celui de HDAC5 dans la perméabilité paracellulaire. Aussi, la consommation d'un régime enrichi en graisses a des effets délétères au niveau iléal en diminuant l'activité HDAC globale, en induisant l'expression de HDAC5 et en réprimant l'expression de gènes importants pour la reconnaissance et la prise en charge des bactéries. Ainsi, les résultats obtenus montrent que le régime HF créerait un microenvironnement spécifique au niveau de l'iléon, qui serait favorable à l'implantation des bactéries au niveau de la muqueuse. Les données obtenues confirment également que le ciblage de HDAC5 pourrait être une stratégie intéressante, tout comme un rééquilibrage alimentaire, afin de limiter la colonisation intestinale par les bactéries AIEC chez les patients atteints de maladie de Crohn.

## Introduction de la publication n°2

---

À ce jour, il n'existe pas de traitement curatif de la maladie de Crohn. Les thérapies disponibles actuellement permettent seulement de soulager les symptômes des patients et ont pour but d'augmenter la durée des rémissions cliniques. Une meilleure compréhension de cette maladie est nécessaire pour développer des thérapies plus spécifiques et personnalisées pour les patients. La MC résulte de l'interaction complexe entre des facteurs génétiques, environnementaux et microbiens. Comme mentionné précédemment, les bactéries AIEC, que l'on trouve avec une plus forte prévalence au niveau des lésions iléales des patients atteints de MC comparativement aux contrôles, semblent particulièrement impliquées dans l'étiologie de la maladie (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998, 2004; Nadalian *et al.*, 2021; Palmela *et al.*, 2018). En effet, elles sont capables d'adhérer et d'envahir les CEIs, d'altérer la fonction barrière de l'épithélium intestinal et sont également capables de survivre et de se répliquer au sein des macrophages, *via* l'induction de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  (Boudeau *et al.*, 1999; Chervy *et al.*, 2020; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Denizot *et al.*, 2012; Glasser *et al.*, 2001).

La capacité d'adhésion des AIEC avec les CEIs repose principalement sur l'interaction de l'adhésine bactérienne FimH, une lectine localisée à l'extrémité des pili de type I, avec la glycoprotéine CEACAM6, qui est anormalement exprimée dans la muqueuse iléale des patients atteints de MC et qui présente des résidus mannoses pouvant être reconnus par FimH (Barnich *et al.*, 2007). Le ciblage spécifique des AIEC apparaît donc être une stratégie intéressante chez les patients atteints de MC et porteurs de ces bactéries pathobiontes. Différentes approches ciblant les AIEC sont actuellement évaluées dans des modèles précliniques ou cliniques pour limiter l'invasion de la muqueuse intestinale par les AIEC. On peut par exemple citer les études évaluant l'efficacité de la phagothérapie pour éliminer les AIEC ou celle évaluant le potentiel de molécules antagonistes de FimH pour réduire la colonisation intestinale par les AIEC (Galtier *et al.*, 2017; Sivignon, Yan, *et al.*, 2015). Toutefois, un modèle préclinique robuste reproduisant au mieux la MC est requis pour valider de nouveaux agents thérapeutiques. Actuellement, pour obtenir une colonisation intestinale par les AIEC, les modèles murins utilisés sont soit traités avec des antibiotiques, soit génétiquement modifiés ou soit traités avec du DSS pour induire une micro-inflammation intestinale et favoriser l'implantation des AIEC (**Table 2**) (Bretin *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2008; Small *et al.*, 2013; Spalinger *et al.*, 2022). Il n'est pas possible de reproduire l'interaction AIEC/CEACAM6 *in vivo* du fait de l'absence de gène orthologue à *CEACAM6* dans le génome murin. Dans le modèle CEABAC10 utilisé dans plusieurs études, les souris portent un transgène codant pour 4 gènes appartenant à la famille CEACAM, dont *CEACAM6*, sous le contrôle du promoteur humain. Cela permet l'expression de *CEACAM6* préférentiellement au niveau du côlon, où *CEACAM6* est exprimé chez l'Homme en condition physiologique. Dans ce modèle, il a été

démontré que les AIEC étaient capables de coloniser la muqueuse des souris, *via* l'interaction CEACAM6/FimH, et d'induire une réponse inflammatoire (Carvalho *et al.*, 2009). Toutefois, les patients atteints de MC présentent une expression anormale de *CEACAM6* au niveau de l'iléon faisant du modèle CEABAC10, un modèle sous-optimal pour reproduire la colonisation iléale par les AIEC.

Ainsi, un nouveau modèle murin transgénique a été développé afin de reproduire au mieux la physiopathologie de la MC iléale. Dans ce modèle « Vill-*hCC6* », l'expression du gène humain *CEACAM6* est contrôlée par le promoteur du gène murin *Villin*, permettant de reproduire l'expression anormale de *CEACAM6* au niveau de l'intestin grêle. L'objectif de ce travail était de caractériser ce nouveau modèle en (1) analysant l'expression et la glycosylation de *CEACAM6* au niveau intestinal, (2) évaluant *ex vivo* l'interaction AIEC-entérocyte et en (3) étudiant *in vivo* la colonisation intestinale par les AIEC chez les animaux transgéniques.

## RESOURCE ARTICLE

# An adherent-invasive *Escherichia coli*-colonized mouse model to evaluate microbiota-targeting strategies in Crohn's disease

Adeline Sivignon<sup>1,2,‡</sup>, Mélissa Chervy<sup>1,\*</sup>, Caroline Chevarin<sup>1,\*</sup>, Elia Ragot<sup>1</sup>, Elisabeth Billard<sup>1,2</sup>, Jérémy Denizot<sup>1,2</sup> and Nicolas Barnich<sup>1,2,‡</sup>

## ABSTRACT

Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) were investigated for their involvement in the induction/chronicity of intestinal inflammation in Crohn's disease (CD). AIEC gut establishment is favoured by overexpression of the glycoprotein CEACAM6 in the ileal epithelium. We generated a transgenic mouse model, named 'Vill-hCC6', in which the human *CEACAM6* gene was under the control of the villin promoter, conditioning expression in the small intestine. We demonstrated that CEACAM6 is strongly expressed in the small intestine mucosa and is correlated with numerous glycosylations displayed at the brush border of enterocytes. *Ex vivo*, the AIEC–enterocyte interaction was enhanced by CEACAM6 expression and necessitated the presence of the bacterial adhesive factor FimH. Finally, AIEC bacteria preferentially persisted in a FimH-dependent manner in the ileal mucosa of Vill-hCC6 mice compared to wild-type mice. This preclinical model opens new perspectives in the mechanistic study of the AIEC pathobiont and represents a valuable tool to evaluate the efficacy of new strategies to eliminate AIEC implanted in the ileal mucosa, such as phages, inhibitory and/or antivirulence molecules, or CRISPR-based strategies targeting virulence or fitness factors of AIEC bacteria.

**KEY WORDS:** AIEC, Ileal colonization, Mouse model, Crohn's disease, CEACAM6

## INTRODUCTION

Crohn's disease (CD) is an inflammatory bowel disease characterized by an abnormal immune response of the intestinal mucosa to environmental and bacterial triggers. To date, no curative treatment exists for CD patients, and current therapies only control the symptoms of the disease and aim to increase the time between relapses. It is therefore essential to identify the causes of the disease to develop more specific and personalized therapies. To date, the aetiology of CD is only partially understood, but it is clear that it results from complex interactions between environmental, genetic and microbial factors. Among the microbial factors identified as

taking part in the onset and maintenance of the disease, a specific pathotype of *Escherichia coli* has been implicated, adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) pathobiont bacteria, which are highly prevalent in ileal lesions of CD patients (Darfeuille-Michaud et al., 2004; Nadalian et al., 2021). We recently reported that AIEC encroachment to the ileal mucosa of CD patients is predictive of endoscopic postoperative recurrence at 6 months postsurgery, suggesting that AIEC-targeting therapeutic strategies could be of interest in the management of CD (Buisson et al., 2022). The adhesion ability of AIEC to intestinal epithelial cells (IECs) mainly relies on FimH adhesin, a mannose-binding lectin located at the tip of type 1 pili (Dreux et al., 2013; Boudeau et al., 2001). In the ileal mucosa of CD patients, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) glycoprotein is abnormally expressed and harbours mannose residues recognized by bacterial FimH, thus favouring AIEC adhesion to IECs (Barnich et al., 2007). These bacteria play an important role in the induction and/or maintenance of intestinal inflammation through invasion of IECs, alteration of epithelial barrier integrity, and their ability to survive and replicate within macrophages, inducing secretion of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Chervy et al., 2020; Denizot et al., 2012; Sasaki et al., 2007; Douadi et al., 2022).

Based on these studies, many AIEC-targeting strategies are currently under investigation in preclinical models and in clinical trials to limit AIEC blooming and invasion of ileal mucosa. For example, the efficacy of antibiotics (TEOREM, NCT02620007) or phagotherapy (Galtier et al., 2017) (EcoActive, NCT03808103) to kill AIEC, or FimH antagonists (Sivignon et al., 2015b) (Sibofimloc, NCT03943446) and yeast probiotics (Sivignon et al., 2015a, 2021) to decrease AIEC gut colonization, are currently under study. However, a well-established and validated preclinical model closely mimicking AIEC-induced CD pathogenesis is required to validate new therapeutic agents targeting AIEC bacteria. To date, most published studies have used antibiotic-treated mice, dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis or genetically susceptible mouse models to reach AIEC colonic colonization (Spalinger et al., 2022; Carvalho et al., 2008; Bretin et al., 2018). The mouse genome lacks a human *CEACAM6* gene orthologue, making it difficult to reproduce the AIEC–CEACAM6 interaction *in vivo*. In previous studies, we used the humanized carcinoembryonic antigen bacterial artificial chromosome 10 (CEABAC10) mouse model, in which we showed that AIEC bacteria are able to colonize the colonic mucosa of mice in a CEACAM6/FimH-dependent manner and to induce an inflammatory response (Chan and Stanners, 2004; Carvalho et al., 2009; Lucchini et al., 2021; Sivignon et al., 2021). CEABAC10 mice carry a transgene encoding four genes of the CEACAM family members, including the *CEACAM6* gene. Of note, the transgene used in this mouse model is under the control of the human promoter,

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, Inserm U1071, INRAE USC 1382, Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte (M2ISH), Clermont-Ferrand 63001, France. <sup>2</sup>Institut Universitaire de Technologie, Génie Biologique, Aubière 63172, France.

\*These authors contributed equally to this work

‡Authors for correspondence (nicolas.barnich@uca.fr; adeline.sivignon@uca.fr)

id A.S., 0000-0003-2288-2959; E.B., 0000-0002-6066-4584; J.D., 0000-0003-0078-8996; N.B., 0000-0001-9465-7844

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 that the original work is properly attributed.

Handling Editor: David M. Tobin

Received 30 June 2022; Accepted 20 September 2022

directing the expression of *CEACAM6* to colonic epithelial cells only, in which *CEACAM6* is physiologically expressed in humans. However, CD patients abnormally express *CEACAM6* in the ileal mucosa, making CEABAC10 a suboptimal model for studying AIEC encroachment to the ileum (Barnich et al., 2007). These observations led us to drive human *CEACAM6* gene expression in small intestinal IECs to develop a new humanized mouse model that closely mimics the pathophysiology of ileal CD.

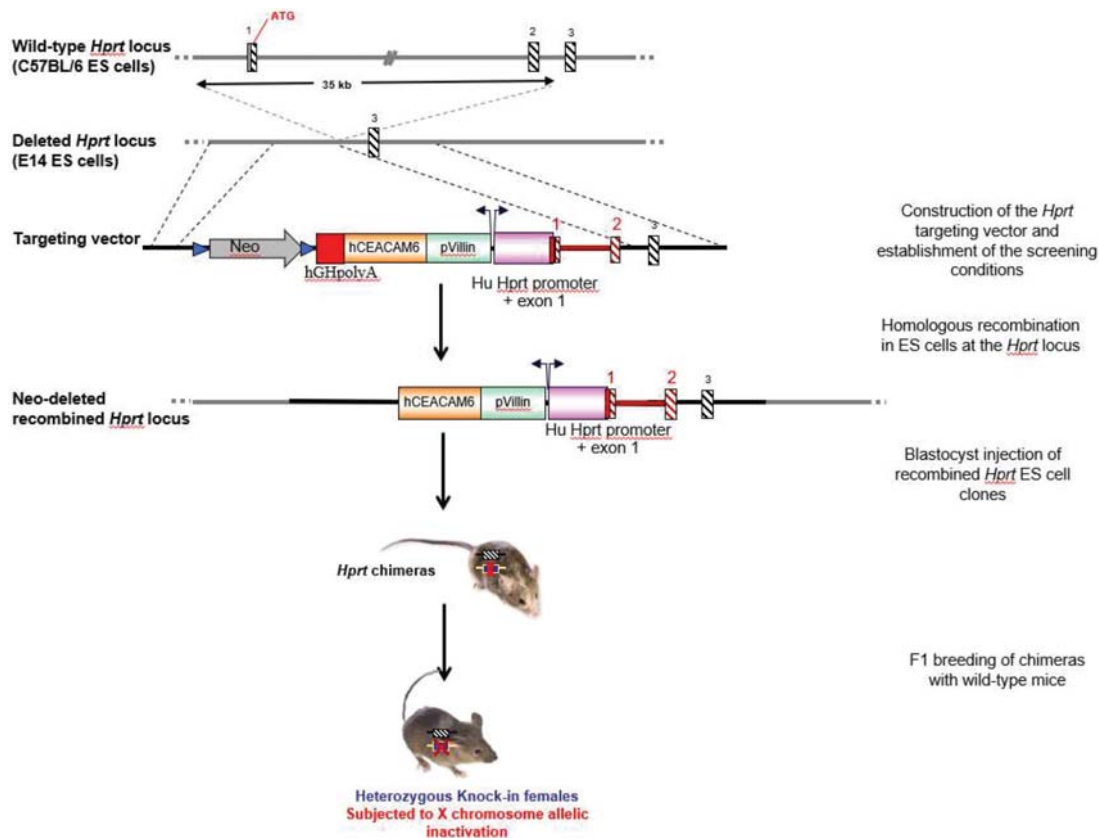
In this work, we describe a new mouse model named ‘Vill-*hCC6*’, in which *CEACAM6* expression is driven by the mouse villin [also known as villin 1 (*Vill*)] gene promoter, reproducing abnormal overexpression of the mannosylated human receptor *CEACAM6* in the small intestine and allowing ileal colonization by AIEC bacteria, as observed in CD patients. Here, we present *ex vivo* and *in vivo* AIEC–enterocyte interaction tests and show that *CEACAM6* overexpression in small intestine enterocytes correlates with high glycosylation of intestinal mucosa, favouring AIEC adhesion. We also validated our model using a type 1 pili-deficient AIEC strain, which shows decreased AIEC interaction with IECs. This model will be useful for screening and evaluating innovative strategies targeting the gut microbiota and, more specifically, the AIEC pathobiont, one possible trigger of intestinal inflammation.

**RESULTS**

**Human *CEACAM6* is highly expressed in the mucosa of the small intestine in Vill-*hCC6* mice**

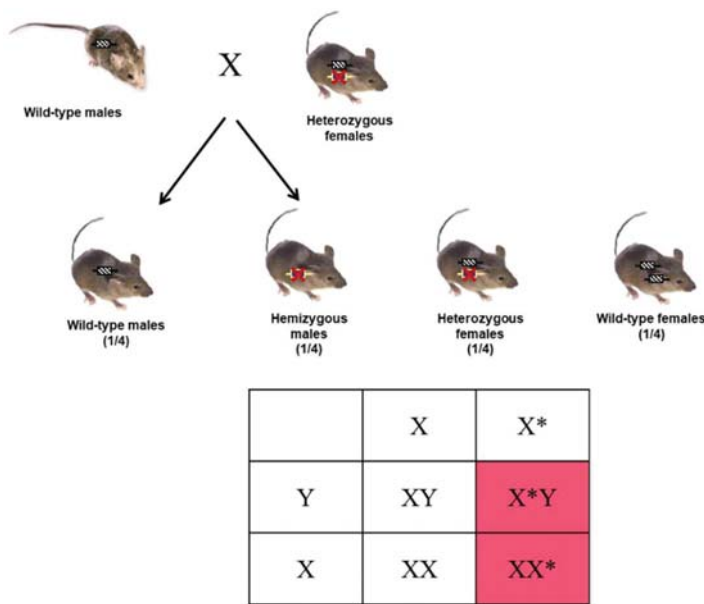
A novel model of transgenic mice expressing the human *CEACAM6* protein in the ileal mucosa was generated as described in Fig. 1. The human *CEACAM6* transgene under the control of the mouse villin gene promoter was introduced into the murine *Hprt* locus to generate the knock-in mouse model ‘Vill-*hCC6*’. Heterozygous female mice are viable, fertile, reproduce normally and can nurse their litter naturally. Hemizygous males were obtained by breeding heterozygous females with wild-type (WT) C57BL/6 males (Fig. 2). Knock-in mice do not show evident morphological and developmental alterations or signs of abnormal behaviour.

Mucosal *CEACAM6* expression at different localizations of the intestine of Vill-*hCC6* hemizygous males was assessed by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) (Fig. 3A) and western blotting (Fig. 3B; Fig. S4). As expected, the expression of *CEACAM6*, which is under the control of the villin promoter, is high in the small intestine of Vill-*hCC6* mice, from the duodenum to the ileum. The *CEACAM6* pattern of expression along the gastrointestinal tract was evaluated by immunohistochemical analyses performed on formalin-fixed paraffin-embedded intestinal



**Fig. 1. Generation of a Vill-*hCC6* knock-in mouse model harbouring the human *CEACAM6* gene under the control of the villin promoter at the *Hprt* locus.** The solid lines represent intronic sequences. In the targeting vector, hatched black and red boxes represent murine and human *Hprt* exons, respectively. Neomycin and loxP sites are represented by a grey arrow and blue triangles, respectively, and the red box depicts hGHpolyA. In recombinant E14Tg2a (E14) embryo-derived stem (ES) cells, the *Hprt* gene was reconstituted by introduction of the human promoter (pink box) and exons 1 and 2. Orange and green boxes represent human *CEACAM6* cDNA and the villin promoter, respectively. Recombined ES cell clones were injected into blastocysts to generate chimeric animals. Heterozygous females were obtained following the breeding of the chimeras with wild-type (WT) females. Yellow boxes with red crosses and hatched black boxes represent the knock-in allele and the WT allele, respectively.





**Fig. 2. Global strategy for the generation of hemizygous male mice.** Yellow boxes with red crosses and hatched black boxes represent the knock-in allele and the WT allele, respectively. The asterisks represent the X chromosome carrying the human *CEACAM6* transgene under the control of the villin promoter.

tissues (Fig. 3C; Fig. S5). The small intestine was divided into three equivalent sections corresponding to the duodenum, jejunum and ileum segments. Strong and specific expression of CEACAM6 was detected in the mucosa of the small intestine of Vill-*hCC6* mice. Concerning duodenum and jejunum segments, CEACAM6 staining was homogeneous along the villi, and expression was decreased in the crypts. In the ileum, CEACAM6 was concentrated at the apex of the villi, and specific staining appeared in close contact with the epithelium. Expression was faint in the colon of transgenic mice and totally absent in WT mice.

**CEACAM6 overexpression correlates with strong glycosylation at the brush border of enterocytes in Vill-*hCC6* mice**

In ileal tissues from CD patients, overexpression of *CEACAM6* correlated with high concanavalin A (ConA) lectin staining at the brush border of isolated enterocytes (Barnich et al., 2007). This lectin recognizes D-glucose/D-mannose residues, and one hypothesis is that CEACAM6 may contribute to the high amount of mannose residues exposed at the enterocyte brush border in these patients, which could facilitate AIEC attachment. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled ConA staining was performed on isolated enterocytes from the intestine of Vill-*hCC6* mice and WT littermates. ConA preferentially bound to ileal enterocytes from Vill-*hCC6* mice compared to WT mice, and fluorescence was focused at the brush border of enterocytes (Fig. 4A). By quantifying the intensity of fluorescence localized at the brush border of enterocytes, we observed that glycosylation was significantly increased in the ileum of Vill-*hCC6* mice [260.5±16.6 arbitrary units (AU)] compared to WT mice (173.7±22.4 AU, *P*<0.0001), and that difference remained significant for colonic enterocytes (Fig. 4B). Hence, the CEACAM6 expression level in Vill-*hCC6* mice correlated with the abnormal glycosylation pattern of enterocytes.

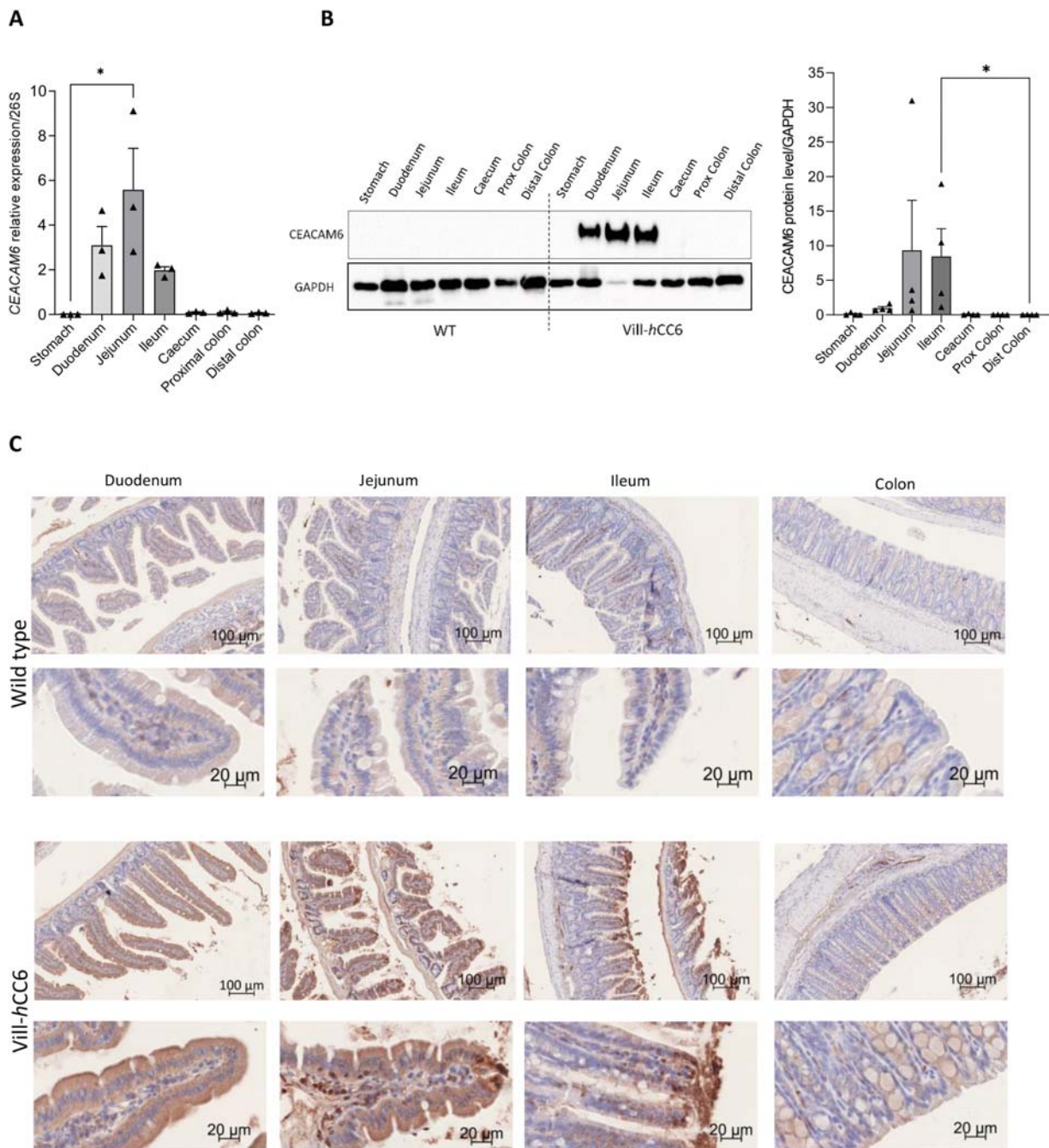
**AIEC bacteria preferentially adhere to enterocytes from Vill-*hCC6* mice in a mannose-dependent manner**

Fresh enterocytes isolated from the ileal mucosa of Vill-*hCC6* mice or their WT littermates were incubated with GFP-expressing AIEC

LF82 bacteria for 2 h. LF82 bacteria firmly adhered to the brush border of ileal enterocytes from Vill-*hCC6* mice (Fig. 5A). Adhesion ability of bacteria to enterocytes was quantified using an adhesion index, corresponding to the mean number of bacteria adhering to the brush border per enterocyte. Although the adhesion index to ileal enterocytes from WT mice was relatively low (0.046±0.018 bacteria/enterocyte), it was notably and significantly higher in the Vill-*hCC6* background (0.415±0.056 bacteria/enterocyte, *P*<0.0001) (Fig. 5B). As type 1 pili are the main adhesion factor of the AIEC pathobiont, the ability of an AIEC LF82 mutant deleted for the FimH adhesin-encoding gene (LF82- $\Delta$ *fimH*) to adhere to enterocytes was investigated (Fig. 5C). The adhesion index of LF82- $\Delta$ *fimH* was drastically decreased compared to that of the WT strain (0.040±0.018 bacteria/enterocyte and 0.363±0.042 bacteria/enterocyte, respectively, *P*<0.0001). Furthermore, the addition of mannose nearly abrogated the bacterial adhesion of the AIEC LF82 WT strain to the brush border (0.010±0.007 bacteria/enterocyte, *P*<0.0001). Thus, CEACAM6 and type 1 pili play a crucial role in the ability of AIEC LF82 to adhere to intestinal mucosa in the Vill-*hCC6* mouse model.

**AIEC bacteria preferentially persist in the gut of Vill-*hCC6* mice**

The transgenic mouse model Vill-*hCC6* expressing CEACAM6 in ileal epithelial cells represents an interesting new preclinical model to analyse ileal tropism of AIEC and therefore to assess promising anti-AIEC strategies. To investigate the role of the FimH adhesin in the intestinal encroachment of the AIEC pathobiont, Vill-*hCC6* mice were challenged with the AIEC LF82 WT strain or with the LF82- $\Delta$ *fimH* mutant. Faecal AIEC bacteria, reflecting the gut persistence of the pathobiont, were assessed for 10 days. At 10 days postinfection (10 dpi), the bacterial load was significantly decreased in the faeces of mice receiving the nonpilated mutant, whereas the levels of WT LF82 bacteria remained high [2.61×10<sup>6</sup> colony-forming units (CFU)/g and 1.39×10<sup>8</sup> CFU/g, respectively] (Fig. 6A). Furthermore, the LF82- $\Delta$ *fimH* mutant was less able to adhere to the ileal mucosa and induced fewer clinical signs of disease, as reflected by the disease activity index (DAI) score

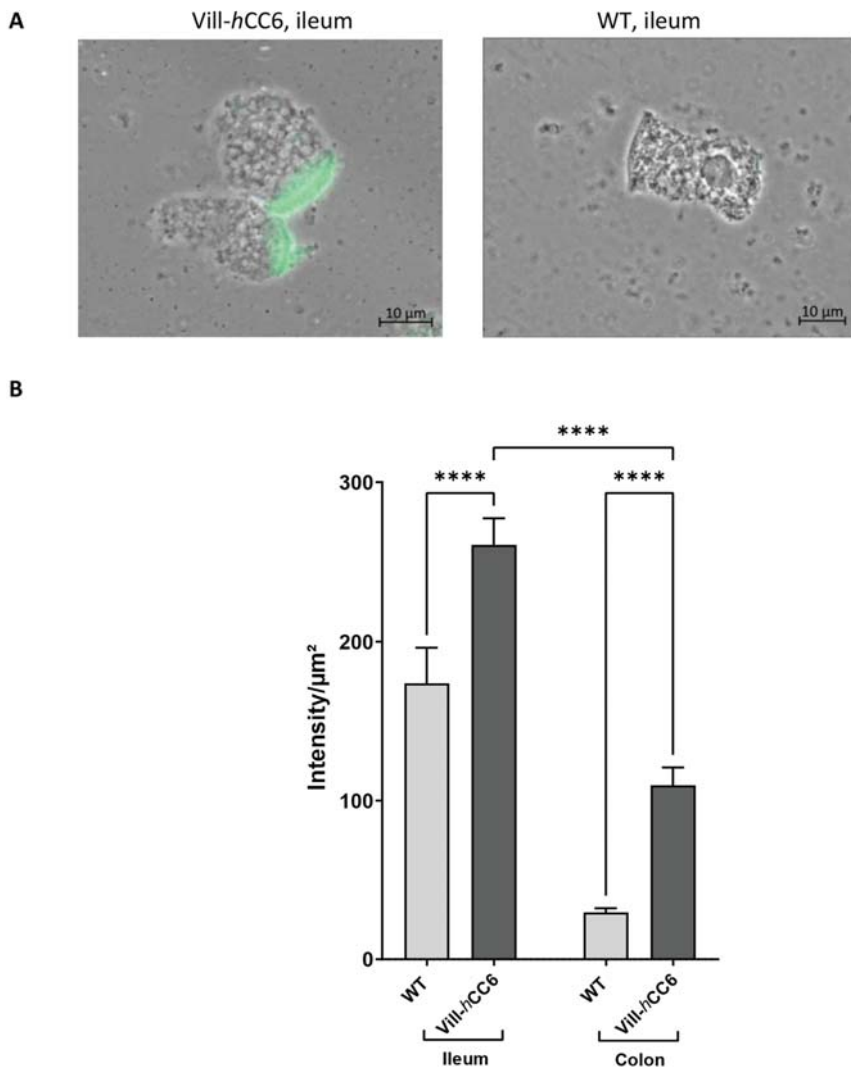


**Fig. 3. Mucosal CEACAM6 expression in the intestine of Vill-hCC6 mice.** (A) Segments of the gastrointestinal tract from Vill-hCC6 mice were opened and washed with cold PBS, and mucosa were collected by scraping with a glass slide. Total RNA was extracted and used for mRNA analysis. The graph shows the RT-qPCR analysis for mRNA expression levels of CEACAM6 relative to *Rps26* (26S),  $n=3$  mice. Data are presented as mean $\pm$ s.e.m.,  $*P<0.05$  (Kruskal–Wallis test). (B) Total proteins were extracted from mucosa collected from the gastrointestinal tract of WT or Vill-hCC6 mice. CEACAM6 accumulation was assessed by western blotting using a monoclonal antibody raised against CEACAM6. Quantification of CEACAM6 expression relative to GAPDH was performed for Vill-hCC6 mice by assessing band intensities ( $n=4$  mice) using the Image Lab software. Data are presented as mean $\pm$ s.e.m.,  $*P<0.05$  (Kruskal–Wallis test). (C) CEACAM6 immunohistochemical staining of intestinal sections of WT or Vill-hCC6 mice. Slides were scanned and assessed with an AxioScan Z1 using Zen 2.3 Pro software.

assessment (Fig. 6B,C). In conclusion, gut establishment of the AIEC pathobiont in Vill-hCC6 mice involves the bacterial FimH adhesin.

The experiment was then performed with other clinical strains of AIEC recently isolated from ileal biopsies of CD patients. Mice were challenged with a mix of four AIEC strains (CEA614S,

CEA618U, CEA212U, CEA304S). Bacteria were quantified in the faeces for 21 days as the bacterial load was still high in the faeces of both groups at 14 dpi, and mucosa-associated bacteria were numbered at euthanasia. Although the AIEC bacterial load remained high and stable for 21 days in the Vill-hCC6 mice ( $2.12 \times 10^9$  CFU/g of faeces at 21 dpi), it decreased in WT mice at



**Fig. 4. Analysis of glycosylation at the brush border of enterocytes isolated from intestinal mucosa of Vill-hCC6 or WT mice.** Sections (3 cm) of distal ileum or colon were collected from WT or Vill-hCC6 mice, and isolated enterocytes were prepared as described in the Materials and Methods section. (A) Enterocytes of WT or Vill-hCC6 mice were incubated for 1 h with FITC-labelled concanavalin A at 50 μg/ml in PBS and visualized using phase-contrast microscopy and fluorescence (400×, immersion oil, Axio Observer, Zeiss). (B) The graph shows average fluorescence intensities (intensity/μm<sup>2</sup>) at the brush border of ileal or colonic enterocytes from WT or Vill-hCC6 mice (25–30 enterocytes/mouse; three mice/group). Values represent mean±s.e.m., \*\*\*\*P<0.0001 (Kruskal–Wallis test).

21 dpi (6.53×10<sup>7</sup> CFU/g of faeces) (Fig. 7A). Moreover, significantly more AIEC bacteria were associated with the jejunal and ileal mucosa of transgenic mice compared to those of WT mice (Fig. 7B). Taken together, these data show that AIEC gut colonization is favoured in the Vill-hCC6 transgenic model.

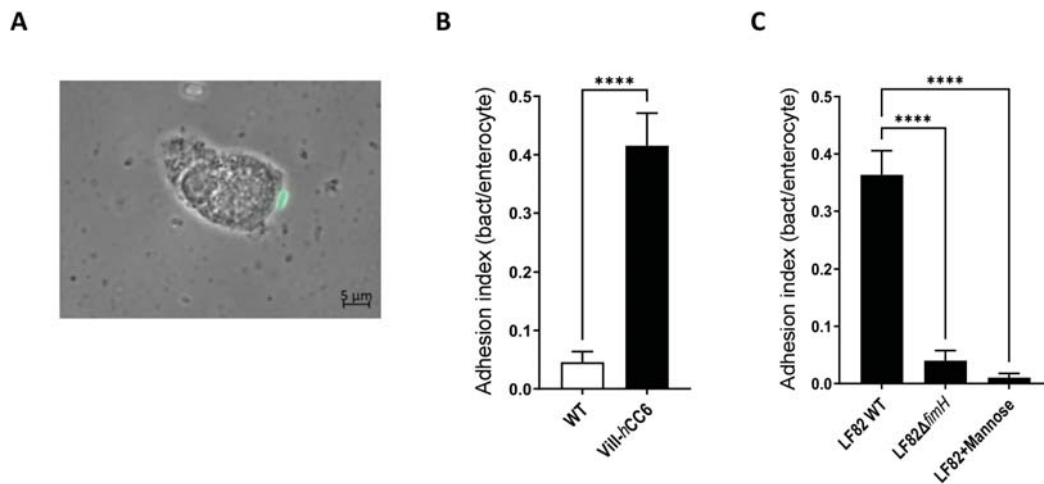
**DISCUSSION**

Future investigations of AIEC pathogenicity and of suitable therapeutic strategies targeting this pathobiont depend on robust animal models and preclinical experimental data. Previous studies demonstrated the key role of CEACAM6 in the ability of AIEC bacteria to colonize intestinal mucosa. Although CEACAM6 is highly present in the human colonic mucosa, the expression of this glycoprotein is very low and even absent in the ileal segment. However, in more than 35% of CD patients, abnormal expression of CEACAM6 is observed, and this overexpression favours AIEC attachment to the epithelium (Barnich et al., 2007). A transgenic mouse model named CEABAC10 and carrying several human CEACAM genes (integrated into a 187-kb bacterial artificial chromosome, among which *CEACAM6*) is already available (Chan and Stanners, 2004). CEABAC10 mice allowed us to better appreciate the role of AIEC bacteria in inflammatory bowel diseases by demonstrating the involvement of the CEACAM6 glycoprotein

in the ability of AIEC strains to adhere to the intestinal epithelium (Carvalho et al., 2009), and to better understand how this colonization modulated intestinal permeability, in particular by inducing the expression of pore-forming claudin 2 (Denizot et al., 2012). They also enabled us to reveal how environmental factors, such as a Western-style diet, favour the gut encroachment of AIEC bacteria (Martinez-Medina et al., 2014; Agus et al., 2014). Furthermore, this model has highlighted in preclinical studies the efficacy of various anti-AIEC strategies, i.e. phage cocktail (EcoActive), various synthetic molecules based on mannose to block the interaction of FimH with CEACAM6, or yeast probiotics such as *Saccharomyces cerevisiae* (whole yeast or yeast extracts) to prevent the implantation of, or to eliminate, AIEC bacteria from the gut (Galtier et al., 2017; Sivignon et al., 2015a,b, 2021). However, the limitation of this model relies on the fact that CEACAM6 expression is mainly located in the colon, whereas it remains very low in the small intestine. Thus, the mechanisms of AIEC–intestinal epithelium interactions as well as the ability of anti-AIEC strategies to limit/eliminate bacteria have only been investigated at the colon level in this model.

In gnotobiotic mice monocolonized with AIEC bacteria, the results showed that AIEC bacteria require flagellar mobility to cross the mucus layer and to reach the surface of the epithelium





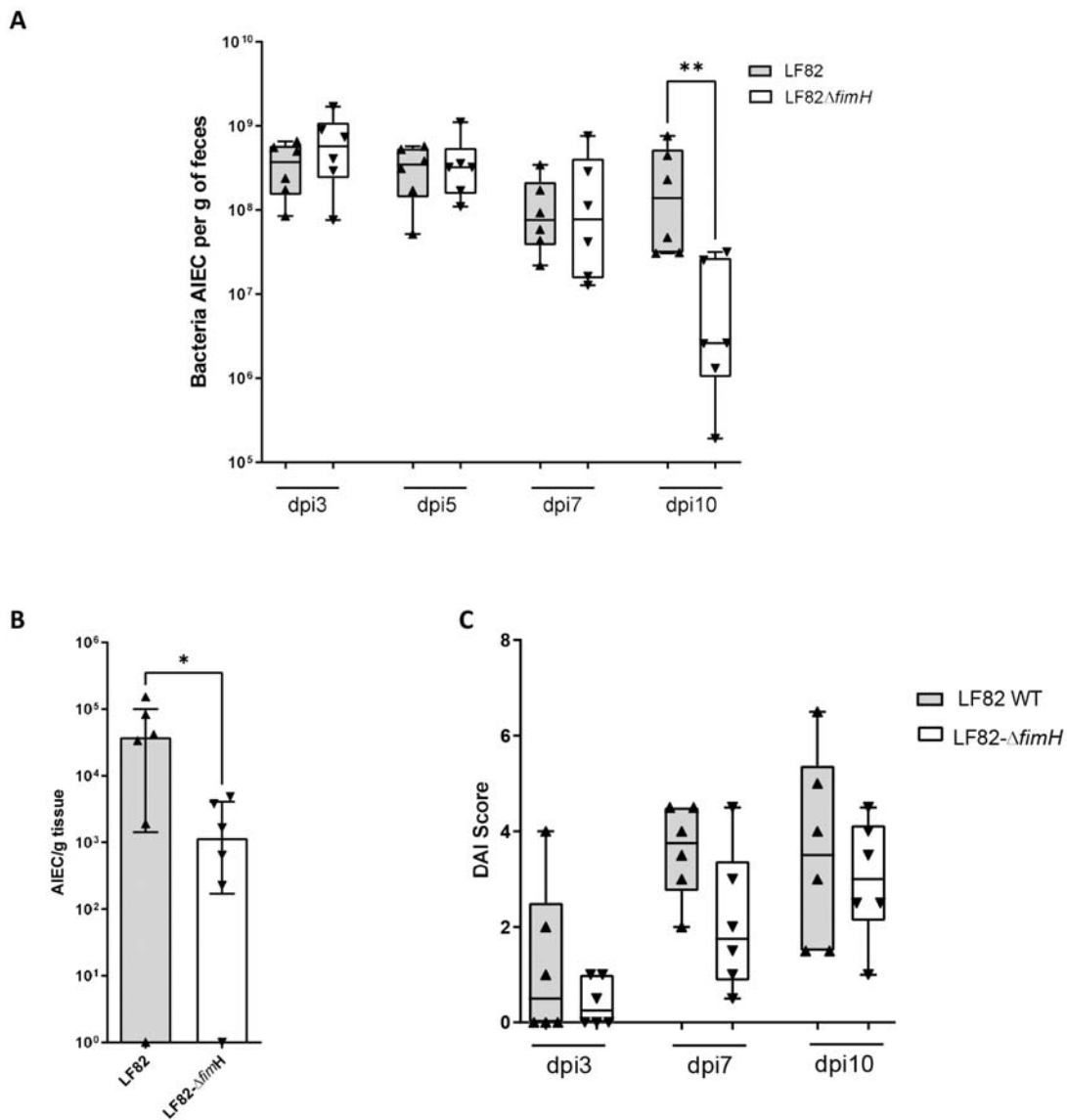
**Fig. 5. Assessment of the ability of the adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) LF82 bacterial strain to adhere to the brush border of ileal enterocytes of Vill-hCC6.** Sections (3 cm) of distal ileum were collected from WT or Vill-hCC6 mice, and enterocytes were prepared as described in the Materials and Methods section. Enterocytes were infected for 2 h with bacteria (~10 bacteria/enterocyte) in cell culture medium without antibiotics then were washed in PBS to eliminate nonadherent bacteria. (A) Adhesion of GFP-expressing AIEC LF82 bacteria to the brush border of an ileal enterocyte from a Vill-hCC6 mouse (phase-contrast/fluorescence microscopy, 400×, immersion oil, Axio Observer, Zeiss). (B) Adhesion index of GFP-expressing AIEC LF82 bacteria to ileal enterocytes, according to the mouse genotype (total enterocytes counted: 197 for WT mice, 236 for Vill-hCC6 mice). (C) Adhesion index to ileal enterocytes from Vill-hCC6 mice of a nonpilated LF82-ΔfimH mutant or LF82 WT in the absence or presence of 2% D-mannose (total enterocytes counted: 245 for LF82 WT, 125 for LF82-ΔfimH and 192 for LF82+D-mannose). Adhesion index was expressed as the mean number of bacteria adhering to the brush border of one enterocyte±s.e.m. Three independent experiments were performed. \*\*\*\**P*<0.0001 (B, Mann–Whitney test; C, Kruskal–Wallis test).

(Sevrin et al., 2020). Various mouse models also highlighted that mucosal metabolites support the general growth of AIEC in the gut, with a selective effect of ethanolamine or serine on AIEC blooming (Zhang et al., 2022; Kitamoto et al., 2020). Another work performed in mice with simplified microbiota (altered Schaedler flora) showed that the addition of AIEC to this ecosystem disrupted microbiota composition and increased levels of bioactive lipopolysaccharide and flagellin, but only modestly promoted some parameters of intestinal inflammation (Chassaing and Gewirtz, 2018). Moreover, genetically susceptible mice with normal microbiota, such as *Eif2ak4*<sup>-/-</sup> mice, exhibiting autophagy defects in response to AIEC infection, demonstrated that AIEC implantation can induce chronic intestinal inflammation via modulation of the composition of the gut microbiota (Bretin et al., 2018). Finally, mouse models in which intestinal inflammation is chemically induced (DSS) or induced by environmental factors (such as a high-fat diet or dietary emulsifiers) indicated that AIEC bacteria can aggravate a pre-existing inflammatory state at the intestinal level (Carvalho et al., 2008; Martinez-Medina et al., 2014; Viennois et al., 2020). Although these models have driven progress in understanding the role of AIEC bacteria in the pathophysiology of inflammatory bowel disease, they do not mimic the ileal AIEC colonization observed in CD patients with ileal involvement.

This limitation led us to develop a new animal model. The original work of our research group showed that AIEC strains were found only in colonic specimens of 3.7% of CD patients versus 1.9% of controls (Darfeuille-Michaud et al., 2004). However, AIEC are especially associated with the ileal mucosa. Indeed, AIEC were found in 21.7% of CD chronic ileal lesions versus in 6.2% of controls, and, in neoterminal ileal specimens, they were found in 36.4% of CD early lesions. Since then, these results have been confirmed by other teams around the world (Kamali Dolatabadi et al., 2021; Nadalian et al., 2021; Palmela et al., 2018). More recently, we investigated the role of AIEC bacteria in CD,

taking advantage of a large prospective cohort of patients with CD undergoing ileocolonic resection. We observed a twofold higher prevalence of AIEC bacteria within biopsies from the neoterminal ileum at 6 months postsurgery compared with surgical specimens (ileal side); moreover, ileal colonization was associated with the early phase of ileal CD recurrence (Buisson et al., 2022).

Thus, to deeply investigate the pathogenicity of the AIEC pathobiont in relation to its attachment to CEACAM6, a novel mouse model was generated, named ‘Vill-hCC6’, with strong CEACAM6 expression in the ileal mucosa. Interestingly, AIEC bacteria were able to highly persist in the gut of mice for up to 21 days after a unique infection, with a significant higher quantity of bacteria associated with jejunal and ileal mucosa in transgenic mice expressing CEACAM6 compared to WT mice. Bacterial attachment to mucosa is associated with a high glycosylation state of CEACAM6-expressing epithelial cells that could thus be targeted by the FimH bacterial adhesin. Indeed, an AIEC mutant deleted from *fimH* was less able to adhere to the ileal mucosa of Vill-hCC6 mice. These data clearly support our hypothesis that CEACAM6 favours AIEC attachment to small intestine mucosa and that FimH plays a crucial role in this interaction. Thus, AIEC-infected Vill-hCC6 mice, modelling ileal CD patients colonized by AIEC pathobionts, could be used in the future as a more appropriate animal model to evaluate, over one or more generations, preventive strategies to limit AIEC ileal colonization, such as the use of natural extracts incorporated in the diet or the use of various probiotics and/or protective microorganisms. Furthermore, the efficacy of new strategies to eliminate AIEC bacteria associated with the ileal mucosa will also be tested in this model, such as phage treatment, inhibitory and/or antivirulence molecules, faecal microbiota transplantation or, as an example, CRISPR-based strategies targeting virulence or fitness factors of AIEC bacteria.



**Fig. 6.** Ability of the AIEC LF82 WT strain or of the nonpilated LF82-Δ*fimH* mutant to colonize Vill-hCC6 mice. Vill-hCC6 mice were treated with streptomycin for 2 days (day -3) and then received water (day -1) for 24 h. Mice were orally administered (day 0) 10<sup>9</sup> colony-forming units (CFU) of AIEC LF82 or LF82-Δ*fimH* bacteria and were killed at 10 days postinfection (dpi). (A) Quantification of AIEC bacteria in the faeces at 3, 5, 7 and 10 dpi (CFU/g of faeces). (B) Quantification of AIEC bacteria associated with the ileal mucosa at 10 dpi (CFU/g of tissue). (C) Disease activity index (DAI) score assessment at 3, 7 and 10 dpi. *n*=6 per group. Values represent median with interquartile range, \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 (Mann-Whitney test).

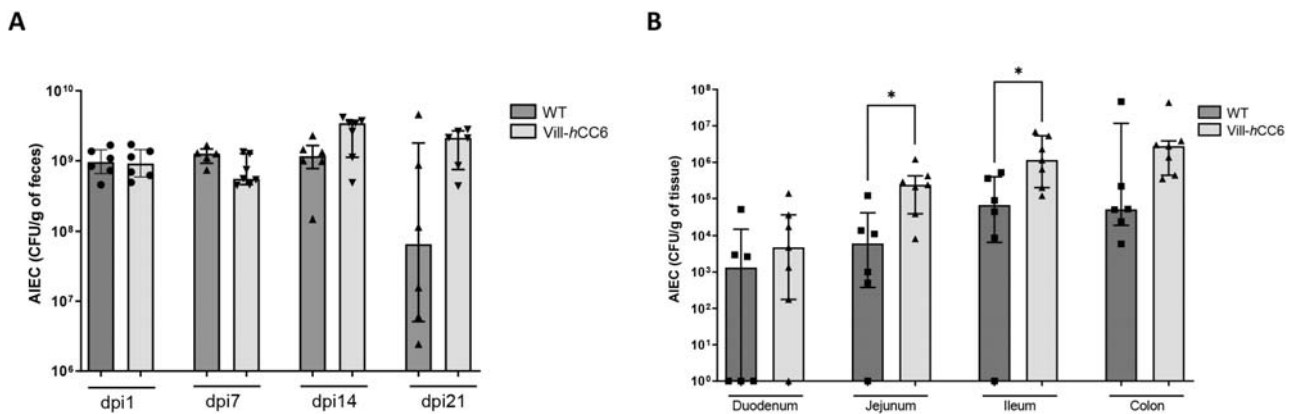
**MATERIALS AND METHODS**

**Generation of the Vill-hCC6 knock-in mouse model**

Vill-hCC6 knock-in mice were generated by genOway (Lyon, France). The human *CEACAM6* cDNA (NM\_002483) under the control of the villin promoter was introduced into the hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*Hprt*) locus by homologous recombination (Fig. 1). The knock-in mice were developed using E14Tg2a [embryonic day (E)14] embryo-derived stem (ES) cells from the 129P2/OlaHsd mouse strain. The targeted insertion repairs the *Hprt* gene deletion in E14 ES cells and rescues the expression of the endogenous *Hprt* gene. After transfection, E14 ES cells with a functional *Hprt* gene were selected using neomycin positive selection (a neomycin cassette flanked by loxP sites was added to the targeting vector) and HAT medium containing hypoxanthine, aminopterin and thymidine substrates to enrich for ES cell clones showing the correct targeting event. Southern blot analyses were performed to confirm the presence of the recombined allele (Fig. S1). ES cell clones were then injected into C57BL/6 blastocysts and implanted into OF-1 pseudopregnant females. Highly chimeric males were

selected for breeding with WT C57BL/6 Cre Deleter females to excise the neomycin selection cassette and to generate heterozygous females carrying the neo-excised knock-in allele. This resulting F1 generation of heterozygous mice was genotyped by PCR to confirm the presence of the transgene (conditions and results are detailed in Table S1 and Fig. S2).

Because the *Hprt* knock-in locus is localized on the X chromosome, it is preferable to analyse the expression of the *CEACAM6* transgene in males (hemizygous) or homozygous females to avoid dealing with the allelic inactivation described for the X chromosome (Lyon, 1961). Hemizygous males were produced from the second generation F2 by breeding WT C57BL/6 males with PCR-validated heterozygous females (Fig. 2). The integrity of the *Hprt* knock-in locus containing the *CEACAM6* gene was further verified by DNA sequencing (Fig. S3). The Vill-hCC6 mouse model was crossed in specific pathogen-free conditions at least nine times with the C57BL/6 strain (Charles River Laboratories, France) to ensure a complete C57BL/6 genetic background and then to maintain the established transgenic model.



**Fig. 7. AIEC gut colonization after an oral challenge with a mix of four AIEC strains (CEA614S, CEA618U, CEA212U and CEA304S) in Vill-hCC6 or WT mice.** Vill-hCC6 or WT mice were treated with streptomycin for 2 days (day –3) and then received water (day –1) for 24 h. Mice were orally administered (day 0)  $10^9$  CFU of AIEC bacterial mix (CEA614S, CEA618U, CEA212U and CEA304S) and were killed at day 21 after administration. (A) Quantification of AIEC bacteria in the faeces at 1, 7, 14 and 21 dpi (CFU/g of faeces). (B) Quantification of AIEC bacteria associated with the intestinal mucosa at 21 dpi (CFU/g of tissue). WT mice,  $n=6$ ; Vill-hCC6 mice,  $n=7$ . Values represent median with interquartile range, \* $P<0.05$  (Mann–Whitney test).

**Animals and ethics**

This study was carried out in strict accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of Clermont Auvergne University (Clermont-Ferrand, France). The animal protocol was approved by the Committee for Research and Ethical Issues of the Department of Auvergne (CEMEA Auvergne; Permit Number: CEMEA, 2018031914539228).

Mice were housed in a temperature-controlled room (21–22°C) with a 12:12-h light–dark cycle in individually ventilated polysulfone cages with an internal area of 500 cm<sup>2</sup> and 18.0 cm depth, wood bedding and appropriate enrichments. Up to a maximum of five animals were housed per cage, with access to food and water *ad libitum*, in the animal facility of Clermont Auvergne University.

**Bacterial strains and culture conditions**

The AIEC strains LF82, CEA614S, CEA618U, CEA212U and CEA304S used in this study were isolated from the ileal mucosa of CD patients requiring ileocolonoscopy (Darfeuille-Michaud et al., 2004; Buisson et al., 2021). AIEC LF82 is naturally resistant to ampicillin and erythromycin. For CEA614S, CEA618U, CEA212U and CEA304S, streptomycin-resistant mutants (AIEC-Stp<sup>R</sup>) were constructed by insertion of the streptomycin resistance-encoding gene on the chromosome using a mobilizable mini-Tn7-based vector (pUC18R6KT-mini-Tn7T-km-Stp). Mini-Tn7 delivery was accomplished by three parental matings involving *E. coli* MFDpir46 harbouring the respective mini-Tn7 delivery plasmid, the AIEC recipient strain, and *E. coli* MFDpir/pTNS3 encoding the *tnsABCD* genes necessary for the transposition of mini-Tn7 at the *attTn7* insertion site (Ferrières et al., 2010). The LF82-GFP strain was constructed using this method and the pUC18R6KT-mini-Tn7T-km-GFP plasmid. A nonpilated chromosomal mutant, LF82- $\Delta$ *fimH*, was used as a control (Dreux et al., 2013). The bacterial strains were grown in Luria Bertani (LB) broth under static and aerobic conditions overnight at 37°C. For *in vivo* experiments, overnight bacterial cultures of AIEC were harvested by centrifugation at 4500 g for 10 min. Bacterial pellets were resuspended in PBS to reach a concentration of  $5 \times 10^9$  bacteria/ml.

**RNA extraction and RT-qPCR**

Total RNA from the mucosa of different sections of the intestine was extracted using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, France) following the manufacturer’s instructions. RNA quality was assessed by a NanoPhotometer® (Implen, Germany). Reverse transcription was performed on 500 ng RNA using a PrimeScript™ RT Reagent Kit (TaKaRa, France). cDNA was diluted (1/10), and 3  $\mu$ l was used for qPCR quantification (iTaq Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad, France). *CEACAM6* relative expression compared to that of the housekeeping gene

*Rps26* (ribosomal protein S26, mRNA) was determined using the 2<sup>- $\Delta$ Ct</sup> method. The primer sequences used were as follows: *CEACAM6* Forward, 5'-GAATGAAGAAGCAACCGAC-3'; *CEACAM6* Reverse, 5'-CAGG-TAGGTTGTGTTCTGAAC-3'; *Rps26* Forward, 5'-TGTCATTTCGGAA-CATTGTAG-3'; *Rps26* Reverse, 5'-GGCTTTGGTGAGGTC-3'.

**Protein extraction and western blotting**

Mucosa from different sections of the gastrointestinal tract (stomach, duodenum, jejunum, ileum, caecum and colon) of Vill-hCC6 and WT mice were scraped with a glass slide and suspended in 300  $\mu$ l lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA pH 8.0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% NP-40, 10% glycerol and 150 mM NaCl). After vortexing, the samples were incubated for 10 min on ice, disrupted for 10 min and centrifuged at 19,000 g for 10 min at 4°C. Supernatants were collected, and total protein contents were assayed with a DC Protein Assay (Bio-Rad). Laemmli buffer was added to the protein extracts (1:4) before boiling (5 min at 99°C). Protein extracts were loaded in a 12% SDS-PAGE gel for electrophoresis migration before transfer to a nitrocellulose membrane (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad). Membranes were incubated for 1 h in blocking buffer (PBS-0.05% Tween 20, 5% bovine serum albumin) and then blotted with the primary antibodies anti-CEACAM6 (1:5000, 9A6 clone, Genovac GmbH, Germany) and anti-GAPDH (1:5000, Cell Signaling Technology, USA) overnight at 4°C. After three washes with PBS-0.05% Tween 20, the membranes were incubated for 1 h at room temperature (RT) with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies diluted in blocking buffer (1:10,000). Membranes were washed three times, and proteins were detected using Enhanced Chemiluminescence substrate (Clarity™ Western ECL substrate, Bio-Rad). Quantification of CEACAM6 expression relative to GAPDH was performed for Vill-hCC6 mice by assessing band intensities ( $n=4$  mice) using Image Lab software 6.1.0 (Bio-Rad Laboratories Inc.).

**Analysis of CEACAM6 expression by immunohistochemistry**

Duodenum, jejunum, ileum or colon samples from WT or Vill-hCC6 mice were fixed in formalin solution (neutral buffered, 10%, Sigma-Aldrich, France) and embedded in paraffin. Slides of intestinal tissues (5  $\mu$ m) underwent unwaxing, rehydration, and antigen retrieval with citrate buffer, and were incubated with 0.3% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 30 min to inactivate endogenous peroxidase activity. The sections were blocked using PBS with 1.5% normal goat serum for 1 h at RT and incubated with anti-CEACAM6 antibody (1:500, 9A6 clone, GM-0509, Genovac GmbH) diluted in PBS with goat serum 1.5% overnight at 4°C. Then, tissues were incubated with an anti-mouse biotinylated secondary antibody (1:500, Interchim, France) for 1 h at RT before incubation with peroxidase-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch, UK) for 30 min at RT.



For visualization, a Vector® NovaRED® Substrate Kit (Vector Laboratories, USA) was used, and tissues were counterstained with Mayer's Haematoxylin. Tissues were then dehydrated, and slides were mounted using Cytoseal™ 60. Slides were scanned with an AxioScan Z1 (Zeiss) and analysed using Zen 2.3 Pro software.

### ConA staining and infection experiments on isolated enterocytes from mice

Enterocytes were isolated from ileal and colonic sections from WT or Vill-*hCC6* mice. Briefly, intestinal sections were longitudinally opened and washed in PBS, and mucosa were scraped with a glass slide. Mucosal suspensions were washed three times in PBS and then incubated in Hanks' balanced salt solution (HBSS)-EDTA 2 mM (Merck, Germany) for 15 min with orbital shaking. Enterocytes were then incubated for 1 h at RT with FITC-labelled ConA (Vector Laboratories, USA) at 50 µg/ml in PBS. After two successive washes, enterocytes were visualized using phase-contrast microscopy and brush borders areas were manually bounded. Glycosylation levels at the brush border of enterocytes were assessed by measuring the average fluorescence intensities (intensity/µm<sup>2</sup>) in brush border areas using Zen Pro 3.3 software (Axio Observer, Zeiss, France).

For AIEC infection assays, fresh enterocytes isolated from the ileum of WT or Vill-*hCC6* mice were prepared as previously described. Enterocytes (~4×10<sup>6</sup> cells) were infected for 2 h at RT with 4×10<sup>7</sup> AIEC bacteria in minimum essential medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum in the presence or absence of 2% D-mannose (Merck, Germany). Nonadherent bacteria were eliminated with two washes with PBS. Adhering bacteria were visualized using phase-contrast/fluorescence microscopy. The adhesion index was determined by counting the mean number of AIEC bacteria associated with the brush border of enterocytes using phase-contrast microscopy (Axio Observer, Zeiss).

### Mouse infection protocol

Vill-*hCC6* or WT male mice (6–8 weeks old) were orally pretreated for 2 days with streptomycin (2.5 g/l) in drinking water to disrupt normal resident (bacterial) intestinal microbiota. Twenty-four hours later, the mice were challenged with 10<sup>9</sup> AIEC bacteria (in 0.2 ml of PBS). Body weight was monitored throughout the experiment. Fresh faecal pellets (~100 mg) were collected at different dpi and homogenized in PBS. Bacteria were numbered by plating appropriate dilutions on LB agar medium containing the appropriate antibiotics to select and isolate AIEC bacteria (LF82 WT and LF82- $\Delta$ *fimH*, 100 µg/ml ampicillin/20 µg/ml erythromycin; AIEC-Stp<sup>R</sup> strains, 100 µg/ml streptomycin) and incubated overnight at 37°C. The severity of colitis was assessed by the DAI score, which ranges from 0 (healthy) to 12 (high colitis activity) as previously described (Sivignon et al., 2015b; Table S2). At 10 or 21 dpi, the mice were anesthetized with isoflurane and killed by cervical dislocation. Intestinal tissues were collected, washed and homogenized in PBS before plating onto antibiotic-selective culture media to count AIEC bacteria associated with the tissue.

### Statistical analysis

Values are expressed as the mean±s.e.m. or as the median. Statistical analyses were performed using Prism 9 (version 9.3.1, GraphPad Software, USA). An unpaired Mann–Whitney test was performed for single comparisons, and the Kruskal–Wallis test was performed for multiple comparisons. *P*<0.05 was considered statistically significant.

### Acknowledgements

We thank genOway (Lyon, France) for generating the Vill-*hCC6* mouse model. pUC18R6KT-mini-Tn7T-km-Stp, pUC18R6KT-mini-Tn7T-km-GFP, *E. coli* MFD<sub>pir</sub> and *E. coli* MFD<sub>pir</sub>pTNS3 were kind gifts from Damien Balestrino (Laboratoire Microorganismes: Génome Environnement, Clermont Auvergne University). We also express our thanks to Abdelkrim Alloui from the animal facility (University Clermont Auvergne); Alexandra Rezard and Sandra Lebeau (M2iSH) for their help with the breeding/genotyping of mice; Christelle Blavignac and Lorraine Novais Gameiro (Centre Imagerie Cellulaire Santé - UCA Partner) for their technical support for paraffin inclusion of intestinal tissues; and Christelle Soubeyrand-Damon from the Anipath platform for her help with immunohistochemical analysis.

### Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

### Author contributions

Conceptualization: A.S., M.C., C.C., E.B., J.D., N.B.; Methodology: A.S., M.C., C.C., E.R., E.B., J.D., N.B.; Validation: A.S., J.D., N.B.; Formal analysis: A.S., M.C., C.C., E.R.; Investigation: A.S., E.B., J.D., N.B.; Resources: N.B.; Writing - original draft: A.S., M.C., C.C., J.D., N.B.; Writing - review & editing: A.S., M.C., C.C., E.B., J.D., N.B.; Visualization: A.S., M.C., J.D., N.B.; Supervision: N.B.; Project administration: A.S., C.C., J.D., N.B.

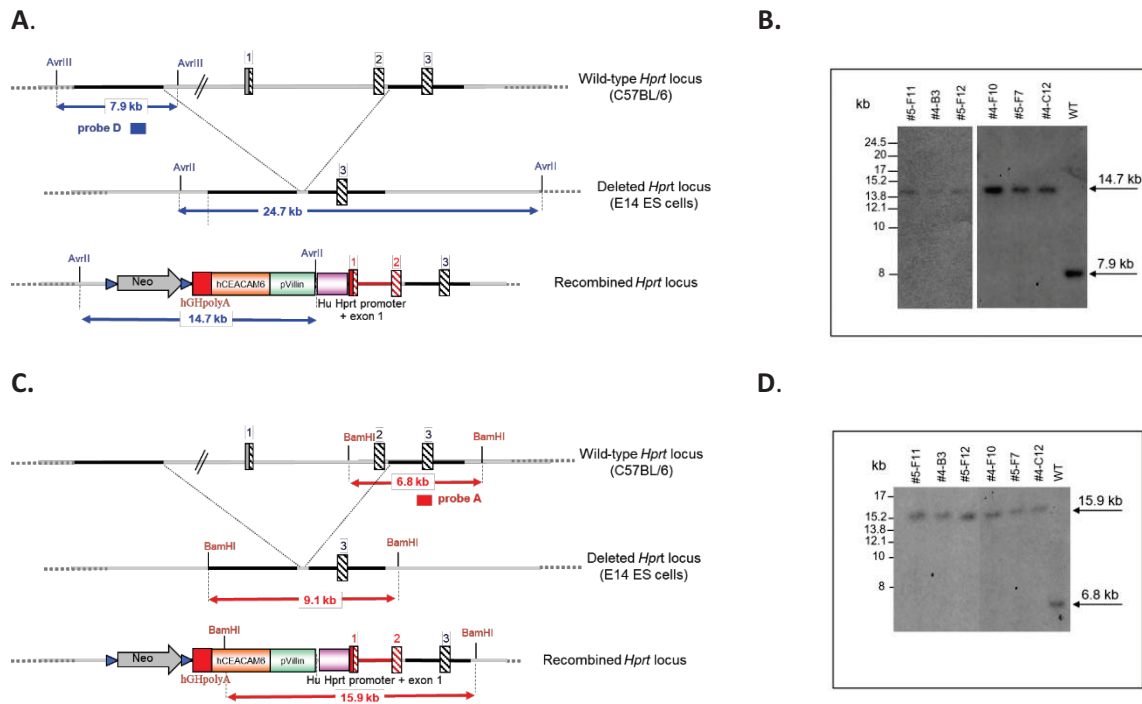
### Funding

This study was supported by Université Clermont-Auvergne/Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm; UMR 1071), Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE; USC 1382), the French government IDEX-I-SITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25), Program Transversal Microbiote (PTM)/Inserm, Association François Aupetit (AFA), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM; ECO201906008953) and Agence Nationale de la Recherche (ANR). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. Open Access funding provided by Université Clermont-Auvergne. Deposited in PMC for immediate release.

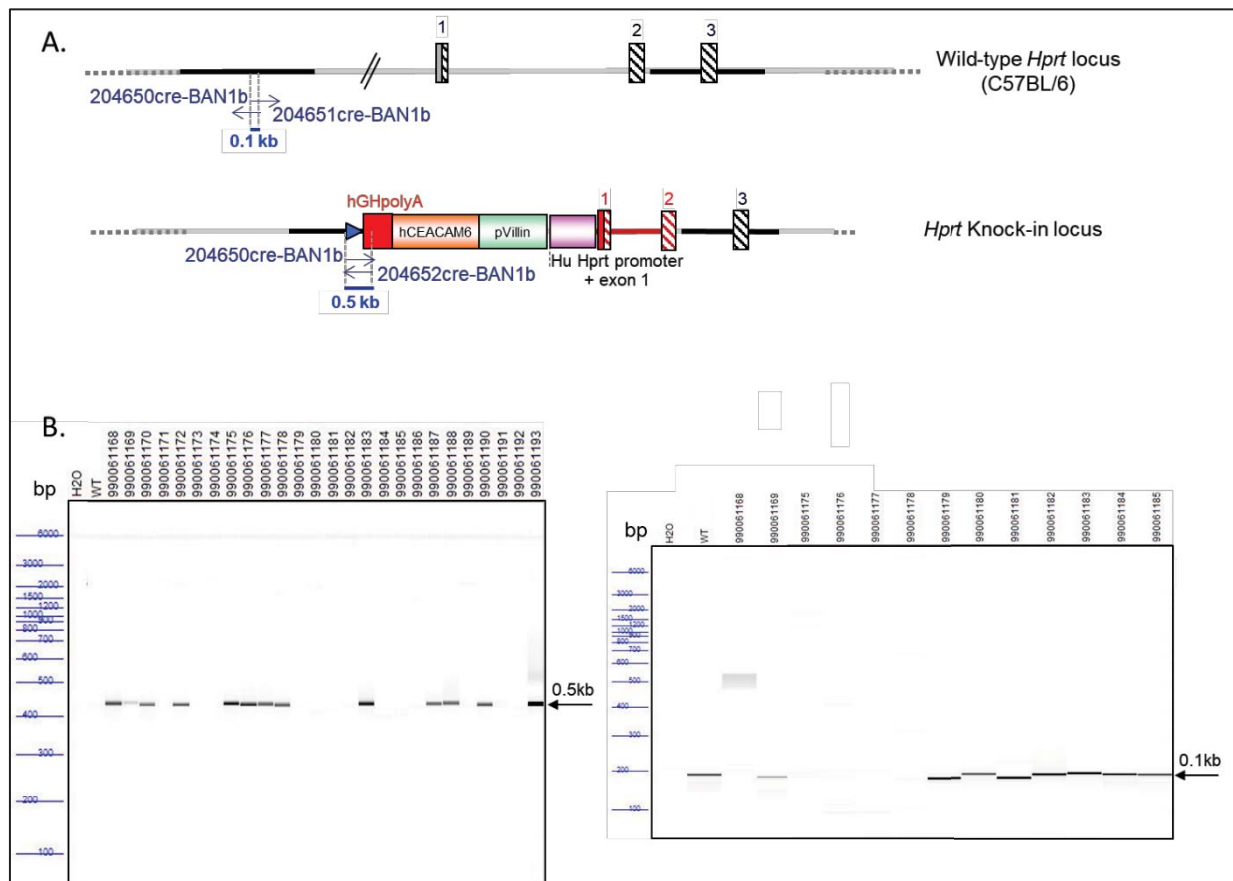
### References

- Agus, A., Massier, S., Darfeuille-Michaud, A., Billard, E. and Barnich, N. (2014). Understanding host-adherent-invasive *Escherichia coli* interaction in Crohn's disease: opening up new therapeutic strategies. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 567929. doi:10.1155/2014/567929
- Barnich, N., Carvalho, F. A., Glasser, A.-L., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., Peeters, H., Bommelaer, G., Desreumaux, P., Colombel, J.-F. et al. (2007). CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J. Clin. Invest.* **117**, 1566–1574. doi:10.1172/JCI30504
- Boudeau, J., Barnich, N. and Darfeuille-Michaud, A. (2001). Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **39**, 1272–1284. doi:10.1111/j.1365-2958.2001.02315.x
- Bretin, A., Lucas, C., Larabi, A., Dalmasso, G., Billard, E., Barnich, N., Bonnet, R. and Nguyen, H. T. T. (2018). AIEC infection triggers modification of gut microbiota composition in genetically predisposed mice, contributing to intestinal inflammation. *Sci. Rep.* **8**, 12301. doi:10.1038/s41598-018-30055-y
- Buisson, A., Vazeille, E., Fumery, M., Pariente, B., Nancey, S., Seksik, P., Peyrin-Biroulet, L., Allez, M., Ballet, N., Filippi, J. et al. (2021). Faster and less invasive tools to identify patients with ileal colonization by adherent-invasive *E. coli* in Crohn's disease. *United European Gastroenterol. J.* **9**, 1007–1018. doi:10.1002/ueg2.12161
- Buisson, A., Sokol, H., Hammoudi, N., Nancey, S., Treton, X., Nachury, M., Fumery, M., Hébuterne, X., Rodrigues, M., Hugot, J.-P. et al. (2022). Role of adherent and invasive *Escherichia coli* in Crohn's disease: lessons from the postoperative recurrence model. *Gut* *gutjnl-2021-325971*. doi:10.1136/gutjnl-2021-325971
- Carvalho, F. A., Barnich, N., Sauvanet, P., Darcha, C., Gelot, A. and Darfeuille-Michaud, A. (2008). Crohn's disease-associated *Escherichia coli* LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin. *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 1051–1060. doi:10.1002/ibd.20423
- Carvalho, F. A., Barnich, N., Sivignon, A., Darcha, C., Chan, C. H. F., Stanners, C. P. and Darfeuille-Michaud, A. (2009). Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J. Exp. Med.* **206**, 2179–2189. doi:10.1084/jem.20090741
- Chan, C. H. F. and Stanners, C. P. (2004). Novel mouse model for carcinomaembryonic antigen-based therapy. *Mol. Ther.* **9**, 775–785. doi:10.1016/j.ymthe.2004.03.009
- Chassaing, B. and Gewirtz, A. T. (2018). Mice harboring pathobiont-free microbiota do not develop intestinal inflammation that normally results from an innate immune deficiency. *PLoS ONE* **13**, e0195310. doi:10.1371/journal.pone.0195310
- Chervy, M., Barnich, N. and Denizot, J. (2020). Adherent-invasive *E. coli*: update on the lifestyle of a troublemaker in Crohn's disease. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3734. doi:10.3390/ijms21103734
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L. and Colombel, J.-F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* **127**, 412–421. doi:10.1053/j.gastro.2004.04.061
- Denizot, J., Sivignon, A., Barreau, F., Darcha, C., Chan, C. H. F., Stanners, C. P., Hofman, P., Darfeuille-Michaud, A. and Barnich, N. (2012). Adherent-invasive

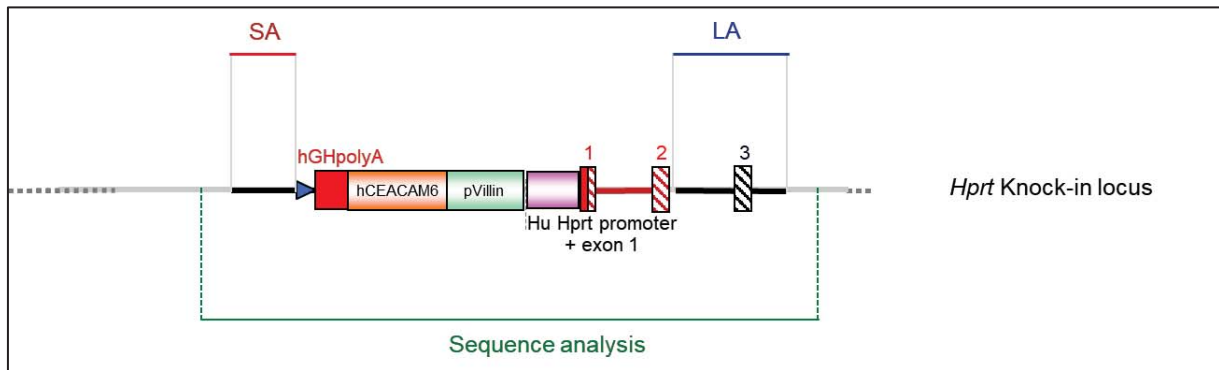
- Escherichia coli* induce claudin-2 expression and barrier defect in CEABAC10 mice and Crohn's disease patients. *Inflamm. Bowel Dis.* **18**, 294-304. doi:10.1002/ibd.21787
- Douadi, C., Vazeille, E., Chambon, C., Hébraud, M., Fargeas, M., Dodel, M., Coban, D., Pereira, B., Birer, A., Sauvanet, P. et al. (2022). Anti-TNF agents restrict adherent-invasive *Escherichia coli* replication within macrophages through modulation of chitinase 3-like 1 in patients with Crohn's disease. *J. Crohns Colitis* **16**, 1140-1150. doi:10.1093/ecco-jcc/ijab236
- Dreux, N., Denizot, J., Martínez-Medina, M., Mellmann, A., Billig, M., Kisiela, D., Chattopadhyay, S., Sokurenko, E., Neut, C., Gower-Rousseau, C. et al. (2013). Point mutations in FimH adhesin of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* enhance intestinal inflammatory response. *PLoS Pathog.* **9**, e1003141. doi:10.1371/journal.ppat.1003141
- Ferrières, L., Hémyery, G., Nham, T., Guérout, A.-M., Mazel, D., Beloin, C. and Ghigo, J.-M. (2010). Silent mischief: bacteriophage Mu insertions contaminate products of *Escherichia coli* random mutagenesis performed using suicidal transposon delivery plasmids mobilized by broad-host-range RP4 conjugative machinery. *J. Bacteriol.* **192**, 6418-6427. doi:10.1128/JB.00621-10
- Galtier, M., De Sordi, L., Sivignon, A., de Vallée, A., Maura, D., Neut, C., Rahmouni, O., Wannerberger, K., Darfeuille-Michaud, A., Desreumaux, P. et al. (2017). Bacteriophages targeting adherent invasive *Escherichia coli* strains as a promising new treatment for Crohn's disease. *J. Crohns Colitis* **11**, 840-847. doi:10.1093/ecco-jcc/ijw224
- Kamali Dolatabadi, R., Feizi, A., Halaji, M., Fazeli, H. and Adibi, P. (2021). The prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* and its association with inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *Front. Med.* **8**, 730243. doi:10.3389/fmed.2021.730243
- Kitamoto, S., Alteri, C. J., Rodrigues, M., Nagao-Kitamoto, H., Sugihara, K., Himpsl, S. D., Bazzi, M., Miyoshi, M., Nishioka, T., Hayashi, A., et al. (2020). Dietary L-serine confers a competitive fitness advantage to Enterobacteriaceae in the inflamed gut. *Nat. Microbiol.* **5**, 116-125. doi:10.1038/s41564-019-0591-6
- Lucchini, V., Sivignon, A., Pieren, M., Gitzinger, M., Lociuoro, S., Barnich, N., Kemmer, C. and Trebosc, V. (2021). The role of OmpR in bile tolerance and pathogenesis of adherent-invasive *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* **12**, 684473. doi:10.3389/fmicb.2021.684473
- Lyon, M. F. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* **190**, 372-373. doi:10.1038/190372a0
- Martinez-Medina, M., Denizot, J., Dreux, N., Robin, F., Billard, E., Bonnet, R., Darfeuille-Michaud, A. and Barnich, N. (2014). Western diet induces dysbiosis with increased *E. coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut* **63**, 116-124. doi:10.1136/gutjnl-2012-304119
- Nadalian, B., Yadegar, A., Houri, H., Olfatfar, M., Shahrokh, S., Asadzadeh Aghdaei, H., Suzuki, H. and Zali, M. R. (2021). Prevalence of the pathobiont adherent-invasive *Escherichia coli* and inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **36**, 852-863. doi:10.1111/jgh.15260
- Palmela, C., Chevarin, C., Xu, Z., Torres, J., Sevrin, G., Hirten, R., Barnich, N., Ng, S. C. and Colombel, J.-F. (2018). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut* **67**, 574-587. doi:10.1136/gutjnl-2017-314903
- Sasaki, M., Sitaraman, S. V., Babbitt, B. A., Gerner-Smidt, P., Ribot, E. M., Garrett, N., Alpern, J. A., Akyildiz, A., Theiss, A. L., Nusrat, A. et al. (2007). Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab. Invest.* **87**, 1042-1054. doi:10.1038/labinvest.3700661
- Sevrin, G., Massier, S., Chassaing, B., Agus, A., Delmas, J., Denizot, J., Billard, E. and Barnich, N. (2020). Adaptation of adherent-invasive *E. coli* to gut environment: Impact on flagellum expression and bacterial colonization ability. *Gut Microbes* **11**, 364-380. doi:10.1080/19490976.2017.1421886
- Sivignon, A., de Vallée, A., Barnich, N., Denizot, J., Darcha, C., Pignède, G., Vandekerckove, P. and Darfeuille-Michaud, A. (2015a). *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 prevents colitis induced by AIEC bacteria in the transgenic mouse model mimicking Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 276-286. doi:10.1097/MIB.0000000000000280
- Sivignon, A., Yan, X., Alvarez Dorta, D., Bonnet, R., Bouckaert, J., Fleury, E., Bernard, J., Gouin, S. G., Darfeuille-Michaud, A. and Barnich, N. (2015b). Development of heptylmannoside-based glycoconjugate antiadhesive compounds against adherent-invasive *Escherichia coli* bacteria associated with Crohn's disease. *MBio* **6**, e01298-15. doi:10.1128/mBio.01298-15
- Sivignon, A., Yu, S.-Y., Ballet, N., Vandekerckove, P., Barnich, N. and Guerdel, Y. (2021). Heteropolysaccharides from *S. cerevisiae* show anti-adhesive properties against *E. coli* associated with Crohn's disease. *Carbohydr. Polym.* **271**, 118415. doi:10.1016/j.carbpol.2021.118415
- Spalinger, M. R., Shawk, A., Chatterjee, P., Canale, V., Santos, A., Sayoc-Becerra, A., Scharl, M., Tremblay, M. L., Borneman, J. and McCole, D. F. (2022). Autoimmune susceptibility gene PTPN2 is required for clearance of adherent-invasive *Escherichia coli* by integrating bacterial uptake and lysosomal defence. *Gut* **71**, 89-99. doi:10.1136/gutjnl-2020-323636
- Viennois, E., Bretin, A., Dubé, P. E., Maue, A. C., Dauriat, C. J. G., Barnich, N., Gewirtz, A. T. and Chassaing, B. (2020). Dietary emulsifiers directly impact adherent-invasive *E. coli* gene expression to drive chronic intestinal inflammation. *Cell Rep.* **33**, 108229. doi:10.1016/j.celrep.2020.108229
- Zhang, S., Morgan, X. C., Dogan, B., Martin, F.-P., Strickler, S. R., Oka, A., Herzog, J., Liu, B., Dowd, S. E., Huttenhower, C. et al. (2022). Mucosal metabolites fuel the growth and virulence of *E. coli* linked to Crohn's disease. *JCI Insight* **7**, e157013. doi:10.1172/jci.insight.157013



**Fig. S1. Southern blot confirmation of homologous recombination events in HAT-resistant E14 embryo-derived stem (ES) cells.** **A.** Schematic representation of the wild-type *Hprt* allele and of the recombined allele with the relevant restriction sites is shown (*related to figure 1*). The strategy for the 5' Southern blot analysis is indicated. **B.** The genomic DNA of the tested ES cell clones was compared with wild-type DNA (C57BL/6). The digested DNA was blotted on a nylon membrane and hybridized with the 5' probe D to detect the AvrII fragment. **C.** Schematic representation of the wild-type *Hprt* allele and the recombined allele with the relevant restriction sites is shown (*related to figure 1*). The strategy for the 3' Southern blot analysis is indicated. **D.** The genomic DNA of the tested ES cell clones was compared with wild-type DNA (C57BL/6). The digested DNA was blotted on a nylon membrane and hybridized with the 3' probe A to detect the BamHI fragment.

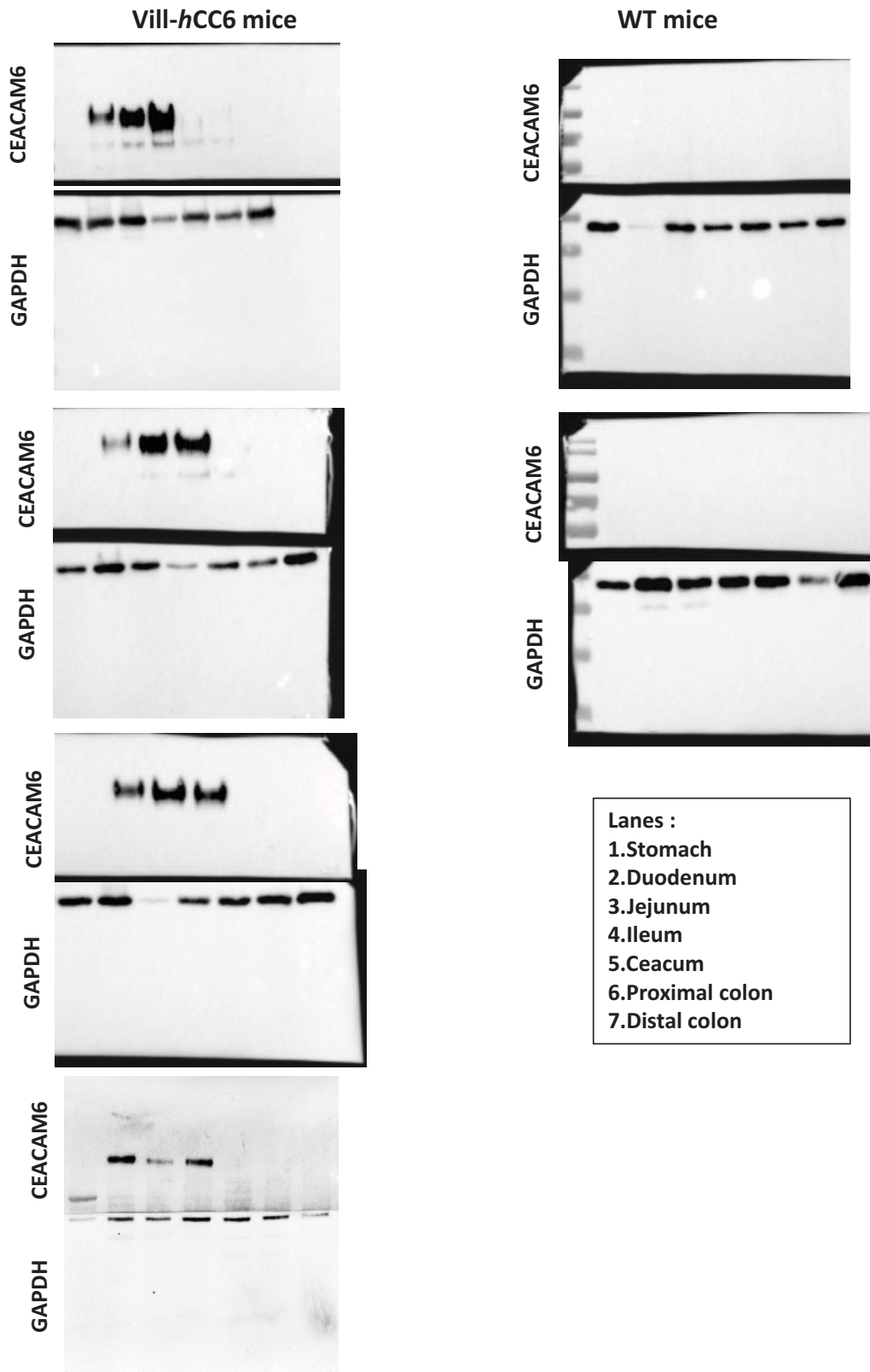


**Fig. S2. Representative PCR results of the heterozygous females of interest.** **A.** Schematic representation of the wild-type and neo-deleted knock-in *Hprt* loci (related to figure 1). Arrows indicate the primer binding sites. The primer sets and the size of the amplification products are indicated. **B.** The left panel shows the results obtained using the primer set to detect the neo-excised recombined *Hprt* allele with a 0.5 kb amplification product, and the right panel shows the results obtained using the primer set to detect the wild-type *Hprt* allele with a 0.1 kb amplification product. Samples containing wild-type genomic DNA (WT) or no DNA (H<sub>2</sub>O) served as positive and negative controls, respectively. PCR fragments were separated by capillary electrophoresis using an AATI ZAG<sup>TM</sup> Fragment Analyzer and were analysed using PROSize 2.0 analytical software.

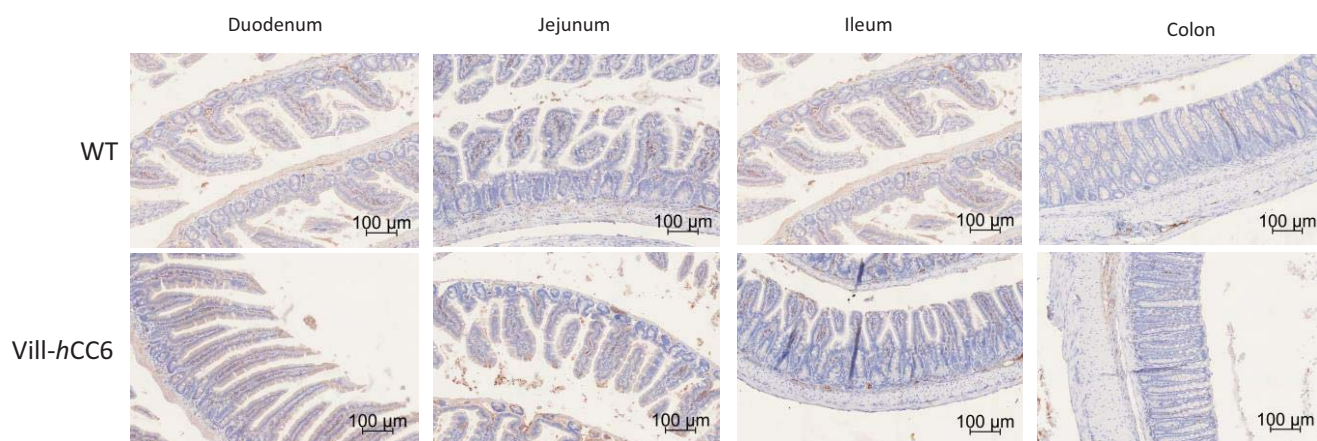


**Fig. S3. Sequence analysis of the identified animals.** Schematic representation of the sequenced knock-in locus, as well as a minimum of 1 kb downstream and upstream of both homology arms. SA: 5' short arm; LA: 3' long arm. Hatched black and red boxes represent murine and human Hprt exons, respectively. The human *CEACAM6* cDNA is depicted as an orange box. Green box represents the villin promoter and pink box represents the human Hprt promoter. The red box depicts hGHpolyA.





**Fig. S4. CEACAM6 expression in the intestinal mucosa of WT or Vill-hCC6 mice.** Uncropped western blots related to figure 3B from Vill-hCC6 and WT intestinal mucosa (n=4 for Vill-hCC6 and n=2 for WT mice).



**Fig. S5. Histological examinations of the intestinal mucosa of wild-type or Vill-hCC6 mice.** Slides were scanned and assessed with an AxioScan Z1 using Zen 2.3 Pro software.

**Table S1. Primers and PCR conditions for Vill-*h*CC6 mice genotyping**

Primers sequences 5'-3'	bp	PCR conditions
<b><i>Hprt</i> wild-type allele</b>		
204650cre-BAN1b: TGTAACCTTAGAACGTCAGTAGTCATAGGAACTGC	176	94°C 120s; (94°C 30s, 65°C 30s, 68°C 300s) x30; 68°C 480s
204651cre-BAN1b: AAAGAATCAATGCTTCCAGTGCTACCA		
<b><i>Hprt</i> Knock-in allele</b>		
204650cre-BAN1b: TGTAACCTTAGAACGTCAGTAGTCATAGGAACTGC	425	Accuprime (Invitrogen)
204652cre-BAN1b: GTGGGACATTTGAGTTGCTTGCTTG		

**Table S2. Score DAI (Disease Activity Index)**

Symptoms/score	Characteristics
<b>Body weight loss</b>	
0	No loss
1	1-5 % loss of body weight
2	5-10 % loss of body weight
3	10-20 % loss of body weight
4	>20 % loss of body weight
<b>Stool consistency</b>	
0	Normal faeces
1	Loose stool
2	Watery diarrhea
3	Slimy diarrhea, little blood
4	Severe watery diarrhea with blood
<b>Blood in stool</b>	
0	No blood
2	Presence of blood
4	Visible bleeding

## Commentaire de la publication n°2

---

Dans cette étude, l'objectif était de caractériser le nouveau modèle transgénique « Vill-*hCC6* ». Dans un premier temps, nous avons démontré que l'expression de CEACAM6, absente chez les souris sauvages, était forte et majoritairement localisée au niveau de l'intestin grêle chez les souris Vill-*hCC6*. De plus, le niveau de glycosylation était significativement plus élevé au niveau de la bordure en brosse des entérocytes iléaux issus des souris Vill-*hCC6* comparativement aux souris sauvages, démontrant une corrélation entre la surexpression de CEACAM6 et le niveau de glycosylation. Dans un second temps, il a été démontré *ex vivo* que l'interaction entre les AIEC et les entérocytes iléaux était significativement augmentée lorsque *CEACAM6* était exprimé et que la présence de l'adhésine bactérienne FimH était nécessaire à cette interaction. *In vivo*, significativement plus de bactéries AIEC étaient associées à la muqueuse intestinale des souris Vill-*hCC6* comparativement aux souris sauvages, ce qui signifie que la colonisation intestinale par les AIEC est favorisée dans le modèle transgénique Vill-*hCC6*. De plus, significativement moins de bactéries AIEC LF82 $\Delta$ *fimH* ont été retrouvées dans les fèces ou associées à la muqueuse iléale des souris Vill-*hCC6* comparativement à la souche AIEC LF82 sauvage, démontrant que l'implantation intestinale des bactéries AIEC implique l'adhésine FimH dans ce modèle. Ainsi, ce nouveau modèle préclinique représente un outil précieux qui permettra de progresser dans l'étude mécanistique de l'interaction AIEC-épithélium intestinal au niveau iléal mais également d'évaluer l'efficacité de nouvelles stratégies ciblant le microbiote intestinal, et plus particulièrement les bactéries AIEC.

Il serait intéressant de refaire une expérience d'infection de souris Vill-*hCC6* et sauvages avec la souche AIEC LF82 ou la souche AIEC LF82 $\Delta$ *fimH* en augmentant la durée du suivi de la colonisation dans les fèces. En effet, dans l'expérience présentée dans l'article, les souris ont été sacrifiées à 10 jours post-infection car la colonisation dans les fèces chutait pour les souris infectées avec la souche mutante. Un arrêt plus tardif n'aurait pas permis la détection des bactéries associées à la muqueuse iléale. Ainsi, augmenter la durée de suivi permettrait d'évaluer la colonisation intestinale à long-terme par la souche AIEC LF82 dans les animaux transgéniques afin de déterminer si le modèle Vill-*hCC6* pourrait mimer une infection chronique par les AIEC. Cela permettrait également de confirmer que les bactéries persistent préférentiellement dans l'intestin des animaux transgéniques comparativement aux souris sauvages et permettrait de déterminer à partir de quel moment il y a élimination complète de la souche mutante. De plus, le nombre d'animaux pourrait éventuellement être augmenté afin d'observer des effets potentiellement plus marqués.

Il serait aussi envisageable d'infecter des souris transgéniques et sauvages avec un « mix » d'AIEC en augmentant le nombre d'animaux pour obtenir des différences significatives au niveau de la colonisation dans les fèces entre les génotypes et confirmer que les AIEC persistent préférentiellement

chez les souris Vill-*hCC6*. De plus, prolonger l'expérience de quelques jours permettrait potentiellement d'observer une chute plus marquée de la colonisation par les AIEC dans les fèces des animaux sauvages. Toutefois, il ne faut pas oublier que la quantification des AIEC dans les fèces reflète davantage la charge bactérienne associée au côlon qu'à l'iléon, seule la quantification des bactéries associée à la muqueuse donne une indication précise du niveau de colonisation intestinale.

Bien que significativement plus de bactéries AIEC étaient associées à la muqueuse iléale des souris Vill-*hCC6* comparativement aux souris sauvages, la différence de charge bactérienne n'est pas si importante que ce à quoi on aurait pu s'attendre. Une hypothèse serait que le gène *CEACAM6* est tellement exprimé dans ce modèle, que la protéine se retrouve sécrétée en forte concentration dans la lumière intestinale, où elle pourrait neutraliser les bactéries avant qu'elles n'atteignent la surface de l'épithélium. Il serait intéressant, dans une prochaine expérience, de traiter les animaux avec du PEG afin d'éliminer le contenu luminal avant l'infection et de déterminer si cela permet d'obtenir une différence plus grande au niveau de la quantité de bactéries associées à la muqueuse iléale entre les 2 génotypes.

En termes de perspectives, ce modèle Vill-*hCC6* permettra d'étudier l'effet de l'infection et de la colonisation iléale par les AIEC sur la perméabilité intestinale mais aussi sur la réponse inflammatoire, *via* des approches de cytométrie en flux ou des dosages ELISA, afin de mieux comprendre comment ces bactéries pathobiontes sont impliquées dans la pathogenèse de la MC. Il serait également intéressant de réaliser des immunomarquages sur des échantillons de muqueuse iléale ou dans les macrophages de la *lamina propria* afin d'observer la présence des bactéries AIEC au sein des cellules de l'hôte *in vivo*, ce qui n'a jamais été vu auparavant.

La MC étant une pathologie multifactorielle résultant de l'interaction de facteurs génétiques, environnementaux et microbiens, on pourrait croiser des animaux Vill-*hCC6* avec des souris portant des mutations dans des gènes de susceptibilité de la MC ou impliqués dans le contrôle de la multiplication intracellulaire des bactéries tels que les gènes *Nod2* ou *Atg1611*. Cela permettrait de générer un modèle murin se rapprochant encore plus de la MC en cumulant plusieurs facteurs et d'étudier le rôle de ces déficiences génétiques sur l'implantation des AIEC dans l'iléon. De la même manière, on pourrait soumettre les souris Vill-*hCC6* à un régime enrichi en graisses de type HF afin d'étudier l'impact de ce facteur environnemental sur la colonisation iléale par les AIEC.



Pour conclure, cette deuxième étude a permis de caractériser un nouveau modèle préclinique, le modèle Vill-*h*CC6 qui permet de reproduire l'expression anormale de *CEACAM6* au niveau de l'iléon, comme cela a été décrit chez les patients atteints de MC. Il a été démontré que les AIEC persistaient préférentiellement chez les animaux transgéniques faisant du modèle Vill-*h*CC6 un bon modèle préclinique de MC iléale. Ce modèle permettra à l'avenir de mieux comprendre le rôle des bactéries AIEC dans la MC et de développer et de tester de nouvelles molécules/stratégies ciblant spécifiquement les bactéries AIEC implantées dans la muqueuse iléale.



# Discussion & Perspectives

## Discussion & Perspectives

---

Les bactéries AIEC sont plus fréquemment trouvées associées à la muqueuse iléale des patients atteints de MC comparativement aux individus contrôles, mais les mécanismes impliqués dans cette colonisation n'ont pour le moment pas été totalement caractérisés (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998, 2004; Palmela *et al.*, 2018). Les objectifs principaux de ce travail de thèse étaient d'identifier des facteurs épigénétiques et environnementaux impliqués dans la colonisation des bactéries AIEC au sein de l'épithélium intestinal des patients, ainsi que de caractériser un nouveau modèle murin de colonisation iléale par les AIEC, afin de mieux comprendre le rôle de ces bactéries dans la physiopathologie de la MC.

Au cours de notre première étude, nous avons identifié HDAC1 et HDAC5 comme des régulateurs épigénétiques centraux et antagonistes de la colonisation intestinale par les Entérobactéries et par les bactéries AIEC. Nous avons également montré l'implication de HDAC1 dans la régulation de la réponse inflammatoire et celle de HDAC5 dans la perméabilité paracellulaire. Concernant le régime HF, nous avons observé que sa consommation entraînait des modifications épigénétiques (diminution de l'activité HDAC globale et induction de l'expression de HDAC5) et transcriptionnelles qui favoriseraient l'implantation des bactéries AIEC au sein de la muqueuse intestinale. Nous avons également étudié les conséquences de l'infection sur l'épigénome de l'hôte en mettant en évidence que les bactéries AIEC étaient capables d'altérer l'activité HDAC globale et l'expression de HDAC5 mais également de moduler l'expression de HDAC1 en contexte HF. Les données générées par ce travail ouvrent de nombreuses perspectives à court, moyen et long terme pour de futures études, perspectives que nous allons discuter dans cette partie dans l'ordre suivant :

- Impact de l'infection et du régime HF sur l'épigénome et conséquences sur la cellule hôte
- Nouveau modèle d'étude de l'interaction AIEC-épithélium intestinal, Vill-*hCC6* : utilisations futures et évolution
- Validation des cibles thérapeutiques en clinique

## **I. Impact de l'infection et du régime HF sur l'épigénome et conséquences sur la cellule hôte**

### **1. Comment les bactéries AIEC et le régime occidental altèrent l'activité HDAC des cellules hôtes ?**

#### **a. Lien de causalité entre acétylation des histones et colonisation par les AIEC ?**

Il a été démontré que le niveau d'acétylation globale de H4 était plus élevé dans des biopsies enflammées de patients atteints de MC comparativement à des tissus contrôles d'individus sains et des tissus non enflammés de patients (Tsaprouni *et al.*, 2011). Aussi, nous avons observé que la présence des bactéries AIEC au niveau iléal chez les patients était associée à l'hyperacétylation de l'histone H3. Ces données suggèrent qu'il existerait un lien entre hyperacétylation des histones, inflammation et AIEC. Aux vues de nos résultats *in vitro* et *in vivo*, il semblerait que l'hyperacétylation des histones favorise l'implantation des bactéries AIEC. En effet, que ce soit dans le modèle de cellules en culture ou chez les souris CEABAC10, l'administration des inhibiteurs se faisait toujours avant l'infection et résultait en une hyperacétylation de H3. Ainsi, une muqueuse intestinale présentant une hyperacétylation des histones serait plus susceptible à être colonisée par des bactéries AIEC, qui tireraient un avantage de la réponse transcriptionnelle altérée dans ces cellules. Une fois installées, les bactéries AIEC pourraient modifier de façon plus importante l'épigénome de l'hôte, que ce soit en inhibant l'activité HDAC ou en induisant l'expression de HDAC5 comme nous l'avons observé, de façon à contrôler la réponse inflammatoire et à favoriser leur persistance.

#### **b. Effet de l'infection sur l'activité HDAC**

Il est intéressant d'observer que contrairement à l'infection par des bactéries pathogènes strictes qui induit majoritairement une réduction du niveau d'acétylation des histones, l'infection par les bactéries pathobiontes AIEC résulte en une hyperacétylation de H3 (Bandyopadhaya *et al.*, 2016; Garcia-Garcia, Barat, *et al.*, 2009; Hamon *et al.*, 2007; Rennoll-Bankert *et al.*, 2015). Cela suggère que les bactéries AIEC utiliseraient des mécanismes spécifiques lors de l'infection de leurs cellules hôtes. Dans les résultats complémentaires, nous avons observé que l'infection de CEIs en culture par la souche AIEC LF82 entraînait une forte diminution de l'activité HDAC, associée à une hyperacétylation de H3, cet effet ne passant pas par une baisse de l'expression ou de l'accumulation des différentes HDACs. Il apparaît important de réitérer la mesure de l'activité HDAC globale en testant d'autres souches AIEC, des souches d'*E. coli* commensales mais également des bactéries invasives telles *Listeria*, afin de déterminer si la diminution d'activité est spécifique des AIEC ou seulement due à un stress cellulaire. Il serait aussi intéressant, à court terme, de confirmer l'inhibition de l'activité HDAC induite par l'infection *in vivo*. Pour cela, les souris transgéniques Vill-*hCC6* pourraient être utilisées et infectées, afin de reproduire la colonisation iléale anormale par les bactéries AIEC observées chez les patients, et l'activité enzymatique des HDACs serait étudiée à partir des CEIs de l'iléon. Il est à noter que l'approche

utilisée dans notre étude mesure l'activité HDAC globale des cellules. Afin de déterminer si l'infection altère spécifiquement l'activité d'une ou plusieurs HDACs, il sera nécessaire de réaliser des immunoprécipitations de chacune des HDACs, individuellement, et mesurer par la suite l'activité HDAC des protéines précipitées. De cette manière, la ou les HDAC(s) dont l'activité est modifiée par l'infection seront identifiées avec précision, permettant de mieux orienter les études futures.

Les mécanismes impliqués dans la diminution de l'activité HDAC par les AIEC ou par le régime HF n'ont pas été identifiés à ce jour. Nous proposons ici, sur la base de nos résultats et des données de la littérature, des hypothèses de travail pour identifier les mécanismes impliqués.

### **c. Identification de facteurs bactériens impliqués dans la modulation de l'épigénome**

Une première hypothèse serait que l'inhibition des HDACs passerait par la capacité des bactéries AIEC à diminuer la concentration intracellulaire en zinc en captant ce métal essentiel à l'activité des HDACs, *via* un transporteur particulier comme un transporteur à ATP-binding cassette (ABC transporter) tel que ZnuABC (Patzer & Hantke, 1998, 2000; Yatsunyk *et al.*, 2008). Le zinc est un oligo-élément essentiel à la fois pour l'hôte mais aussi pour les bactéries pathogènes, et certaines d'entre elles ont développé des stratégies pour capter le zinc (Gammoh & Rink, 2017). C'est notamment le cas de *Yersinia pestis* ou *Salmonella enterica* Typhimurium qui sont capables de capter du zinc grâce à l'expression du transporteur ZnuABC, nécessaire pour leur croissance et leur virulence (Bobrov *et al.*, 2014; J. Z. Liu *et al.*, 2012). L'étude du génome de la souche AIEC LF82 a mis en évidence la présence de ce type de transporteur. À moyen terme, il pourrait être intéressant d'étudier son rôle dans la modulation de l'épigénome de l'hôte grâce à la génération d'un mutant n'exprimant plus ce transporteur. On pourrait également examiner si cet opéron est induit dans l'environnement digestif iléal, d'une façon indépendante de leur contact avec les CEIs, en utilisant un modèle de digestion *in vitro* (TIM), qui permet de reproduire les différentes conditions retrouvées dans l'intestin grêle (Minekus, 2015; Minekus *et al.*, 1995).

La diminution de l'activité HDAC était associée à une augmentation de l'acétylation de H3. Afin d'identifier les gènes des bactéries AIEC impliqués dans la modulation de l'épigénome, il serait intéressant de créer une banque de mutants *via* l'insertion d'un transposon de manière aléatoire dans le génome bactérien. Cela permettra de générer de nombreux clones présentant un site d'insertion unique du transposon et la capacité des mutants à moduler l'épigénome sera criblée *in vitro* par une approche d'immunofluorescence ciblant une marque d'acétylation des histones. Les mutants qui ne seront plus capables de moduler les marques épigénétiques seront séquencés afin d'identifier le(s) gène(s) invalidé(s) par l'insertion du transposon potentiellement responsable(s) du phénotype étudié. Cette approche pourrait permettre d'identifier des gènes bactériens codant pour des protéines capables de



moduler les marques épigénétiques de l'hôte directement (nucléomodulines) ou indirectement (*via* l'altération de voies de signalisation cellulaires).

#### **d. Régulation de l'activité HDAC *via* le microbiote intestinal ?**

Comme il est connu qu'un régime alimentaire enrichi en sucres et en graisses peut impacter le microbiote intestinal, il apparaît important de déterminer si l'effet délétère du régime HF sur l'activité HDAC est dépendant du microbiote ou non (Agus *et al.*, 2016; Martinez-Medina *et al.*, 2014; R. P. Singh *et al.*, 2020; Taira *et al.*, 2015). Pour cela, il serait intéressant de réaliser des expériences de transplantation de microbiote fécal. Le microbiote fécal de souris soumises à un régime Chow ou HF durant 4 semaines sera transféré à des souris axéniques avant d'évaluer l'activité HDAC au niveau de l'iléon à différents temps post-transplantation. Si l'on observe une baisse de l'activité HDAC chez les souris ayant reçu le microbiote des animaux sous régime HF, cela signifiera que l'effet est dépendant de la composition du microbiote intestinal. Si tel est le cas, il faudra par la suite déterminer quelles populations bactériennes ou quels métabolites dérivés de ce microbiote sont à l'origine de cet effet. De plus, bien que compliqué à mettre en place, un objectif à long terme serait de déterminer les conséquences d'une transplantation de microbiote fécal humain de patients atteints de MC sur l'activité HDAC de souris axéniques. En effet, si la diminution de l'activité HDAC est liée à des composants du microbiote intestinal (métabolites, bactéries...) et que ceux-ci sont enrichis chez les patients, l'activité HDAC de la muqueuse intestinale devrait être diminuée, comparativement à ce qui serait observé chez des souris recevant un microbiote de sujet contrôle. Si tel est le cas, nous pourrions ensuite envisager d'infecter les animaux avec des souches AIEC afin d'évaluer leur capacité à s'implanter, et corréler ceci à l'activité HDAC des cellules épithéliales intestinales. Ce travail permettrait de montrer que le microbiote de patients atteints de MC inhibe l'activité HDAC et mène à l'implantation facilitée des AIEC. Enfin, si le phénotype n'est pas transférable par le microbiote, des souris axéniques seront soumises au régime HF afin de déterminer si le régime alimentaire impacte directement l'activité HDAC indépendamment du microbiote intestinal, *via* un mécanisme qu'il restera à déterminer.

#### **e. Effet du régime HF et de l'infection sur les modifications post-traductionnelles des HDACs**

L'activité enzymatique des HDACs peut être régulée par leur état de phosphorylation. En effet, des protéines kinases comme CK2 peuvent phosphoryler les HDAC1, 2 et 3 augmentant leur activité enzymatique tandis que la phosphorylation des HDACs de classe IIa favorise leur interaction avec la protéine chaperonne 14-3-3 menant à leur export nucléaire (Pflum *et al.*, 2001; Seto & Yang, 2010; Tsai & Seto, 2002; X. Zhang *et al.*, 2005). Ainsi, il serait intéressant d'étudier, à court terme, l'état de phosphorylation des HDACs ainsi que leur localisation cellulaire que ce soit suite à l'infection avec les bactéries AIEC *in vitro* ou dans les CEIs issues de l'iléon de souris sous régime HF. Aussi, si des altérations de leur niveau de phosphorylation sont observées, le niveau d'expression des kinases

responsables de la phosphorylation et des phosphatases responsables de la déphosphorylation sera étudié. *S. pneumoniae* induit, via sa déphosphorylation, l'activation de la phosphatase PP1 qui est responsable de la déphosphorylation de H3S10 nécessaire pour une infection efficace (Dong *et al.*, 2020). PP1 est également responsable de la déphosphorylation des HDACs. Ainsi, si les bactéries AIEC sont aussi capables d'activer PP1, et de déphosphoryler les HDACs, cela pourrait expliquer la baisse d'activité HDAC observée *in vitro* suite à l'infection.

#### **f. Conséquences de la diminution de l'activité HDAC sur l'activité de NF- $\kappa$ B ?**

Les HDACs désacétylent majoritairement des protéines histones, mais également des protéines non histones comme des facteurs de transcription et notamment le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, médiateur important de la réponse inflammatoire (T. Liu, Zhang, *et al.*, 2017). Il est donc possible que la diminution de l'activité HDAC induite par le HF et par l'infection impacte l'acétylation de facteurs de transcription ce qui peut modifier leur activité transcriptionnelle et donc entraîner des modifications de l'expression des gènes. Par exemple, sept sites d'acétylation ont été identifiés sur la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B, qui peuvent mener à son activation ou sa désactivation. L'acétylation sur les lysines 122 et 123 diminue sa fixation à l'ADN, alors que l'acétylation des lysines 218 et 221 l'augmente en altérant son association avec I $\kappa$ B $\alpha$ . Aussi l'acétylation de la lysine 310 est cruciale pour son activité transcriptionnelle. Pour finir, l'acétylation sur les résidus Lys314 et Lys315 régule différenciellement l'expression de gènes cibles spécifiques en réponse à une stimulation avec du TNF- $\alpha$ . Ainsi la désacétylation des divers résidus aboutira à des effets différents sur l'activité de NF- $\kappa$ B : la désacétylation des résidus lysine 122, 123, 314 et 315 va entraîner une augmentation de l'expression de gènes inflammatoires tandis que la désacétylation de Lys218 et Lys221 favorise la fixation de p65 avec I $\kappa$ B $\alpha$  menant à la désactivation de NF- $\kappa$ B (Calao *et al.*, 2008; Giridharan & Srinivasan, 2018; B. Huang *et al.*, 2010). Il serait donc judicieux d'étudier l'état d'acétylation de NF- $\kappa$ B en contexte HF mais également en contexte d'infection, ou suite au « silencing » de HDAC1 où il a été observé une dérégulation de l'expression des gènes de l'inflammation, afin de déterminer son activité transcriptionnelle.

#### **g. Rôle des HATs au cours de l'infection ?**

Enfin, l'observation de l'inhibition de l'activité HDAC qui favorise l'entrée des bactéries AIEC au sein des CEIs *in vitro* nous amène à penser qu'il serait intéressant d'étudier les enzymes responsables de l'action opposée des HDACs, les HATs et de déterminer si elles sont également impliquées dans le processus d'invasion des CEIs par les bactéries AIEC. En effet, comme pour les HDACs, leur expression n'est pas modifiée *in vitro* avec l'infection (données non présentées) ce qui n'exclut pas une modulation de leur accumulation ou de leur activité enzymatique en contexte infectieux. De plus, les *Escherichia coli* entéropathogènes et entérohémorragiques sont capables de sécréter une métalloprotéase NleC

capable de dégrader la HAT P300, entraînant une diminution de l'expression de l'IL-8 (Shames *et al.*, 2011). On peut imaginer qu'il s'agit d'un mécanisme commun partagé par les *E. coli* pathogènes et pathobiontes comme les AIEC. Aussi, afin de déterminer si les HATs sont impliquées dans le processus d'entrée des AIEC au sein des cellules hôtes, dans un premier temps, des tests de protection à la gentamycine pourraient être réalisés sur des cellules traitées avec des inhibiteurs de HATs. En fonction des résultats obtenus, des expériences similaires à celles réalisées avec les HDACs pourraient être envisagées afin de caractériser leurs rôles.

## **2. Comment le régime occidental agit sur l'épigénome et sur l'expression des gènes ?**

### **a. Régime HF et expression de peptides antimicrobiens**

Il est connu que la consommation d'un régime HF entraîne une dysbiose chez les animaux caractérisée par une augmentation de la population des *E. coli*, favorisant la colonisation intestinale par les AIEC (Agus *et al.*, 2016; Martinez-Medina *et al.*, 2014). De manière intéressante, il a été observé que la consommation d'un régime HF sur quelques jours, en plus d'entraîner des modifications de la composition du microbiote intestinal, augmentait la susceptibilité des souris à l'infection par *L. monocytogenes*, cette susceptibilité augmentée étant associée à une réduction de l'expression de Reg3 $\gamma$  (Las Heras *et al.*, 2019). Suite à l'analyse transcriptomique, nous avons observé que la consommation du régime HF inhibait l'expression des gènes impliqués dans la défense de l'hôte comme les gènes codant pour des peptides antimicrobiens. Il est donc envisageable que la réduction de l'expression de ces gènes puisse conduire à une diminution de la production de peptides antimicrobiens ce qui pourrait moduler le microbiote intestinal en ne contrôlant plus certaines populations bactériennes, notamment la population d'*E. coli* et expliquerait la prédisposition à la colonisation intestinale par les AIEC. La répression de gènes impliqués dans le processus autophagique (*Irgm1*) suggère également une mauvaise prise en charge des bactéries invasives en contexte HF, qui pourrait favoriser la persistance des bactéries AIEC et leur prolifération au sein de la muqueuse intestinale.

De manière intéressante, nous avons constaté une baisse de l'activité HDAC globale dans l'iléon de souris soumises à un régime HF comparativement aux souris sous le régime contrôle, suggérant un rôle similaire de l'infection et du régime alimentaire enrichi en graisses sur l'activité enzymatique des HDACs. Il serait intéressant de réaliser des expériences de ChIP-seq en ciblant des marques d'acétylation spécifiques afin d'identifier quels gènes présentent un enrichissement en ces marques et de déterminer s'ils pourraient être impliqués dans le contrôle de l'entrée des AIEC dans les CEIs. À la vue de nos résultats de transcriptomique, il est probable que nous observions une diminution de l'acétylation des gènes codant pour les peptides antimicrobiens ainsi que dans des gènes impliqués dans l'autophagie (formation de chromatine compactée). Cette analyse révélera sûrement des régions génomiques fortement acétylées portant des gènes surexprimés en contexte HF.

### **b. Régime HF et perméabilité intestinale**

Le régime HF est également connu pour augmenter la perméabilité intestinale et réprimer l'expression des gènes codant pour des protéines de jonction (Christ *et al.*, 2019; Las Heras *et al.*, 2019; Malesza *et al.*, 2021; Rohr *et al.*, 2020). D'un point de vue mécanistique, il se pourrait que HDAC5 soit, en partie, responsable de ces phénotypes. En effet, suite à l'analyse RNA-seq, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de HDAC5 dans l'iléon des souris sous régime HF ainsi qu'une diminution du ratio HDAC1/HDAC5, qui sont des conditions que nous avons identifiées comme favorisant l'implantation des AIEC dans l'intestin. Aussi, nous avons montré que HDAC5 jouait un rôle dans la perméabilité paracellulaire, son « silencing » induisant l'expression de gènes impliqués dans la formation des jonctions cellulaires (données à valider). Ainsi, on peut imaginer que la surexpression de HDAC5 en condition HF affaiblirait les jonctions entre cellules, dérégulant la fonction barrière de l'intestin et augmentant ainsi la perméabilité intestinale. Cela favoriserait le passage d'antigènes bactériens et le développement d'une inflammation intestinale ce qui pourrait aboutir à la sélection des bactéries AIEC. Une récente étude appuie cette hypothèse puisqu'il été démontré dans un modèle murin de septicémie intestinale, une augmentation de l'expression de HDAC5 dans la muqueuse intestinale qui était associée à des lésions au niveau de l'intestin ainsi qu'à des altérations du complexe jonctionnel intercellulaire et à une augmentation de la perméabilité intestinale. Le « silencing » de HDAC5 ou son inhibition avec le LMK-235 réduisaient la dysfonction intestinale et la perméabilité intestinale chez les souris atteintes de septicémie (B. Li *et al.*, 2021). Ainsi, une perspective à court terme sera d'étudier la perméabilité intestinale chez des souris soumises à un régime HF et traitées ou non avec le LMK-235 afin de déterminer si l'augmentation de la perméabilité intestinale avec le régime HF est dépendante de l'expression augmentée de HDAC5.

### **c. Effets à long terme du régime HF sur l'épigénome**

Le régime HF entraîne des modifications épigénétiques avec l'observation d'une activité HDAC altérée, d'une augmentation de l'expression de HDAC5 et d'une réduction du ratio HDAC1/HDAC5. Sur le long terme, il serait intéressant de déterminer si ces altérations épigénétiques sont réversibles ou non afin de déterminer si un rééquilibrage alimentaire serait potentiellement envisageable et bénéfique chez les patients. En effet, dans certaines études, des modifications épigénétiques persistaient malgré l'arrêt de l'exposition au facteur causal (Jacobsen *et al.*, 2012; Joehanes *et al.*, 2016; Leung *et al.*, 2016). Pour cela, des souris seraient soumises à un régime enrichi en graisses durant 4 semaines avant un retour à un régime conventionnel. L'activité ainsi que l'expression des HDACs seraient étudiées à différents temps suite à l'arrêt du régime HF afin de d'évaluer si les altérations persistent ou non. De plus, plusieurs études ont montré que la consommation d'un régime enrichi en graisses par le mâle ou la femelle pouvaient entraîner des modifications épigénétiques chez les descendants notamment au niveau des profils de méthylation (Q. Chen *et al.*, 2016; Deshpande *et al.*, 2020; Q. Zhang *et al.*, 2019). Ainsi, pour

voir si le régime HF peut induire des altérations épigénétiques transgénérationnelles, des souris femelles seront soumises à un régime HF durant un mois afin de couvrir la gestation et le sevrage des souriceaux. Les descendants seront ensuite nourris avec un régime conventionnel jusqu'à l'âge adulte, période à laquelle l'activité et l'expression des HDACs seront analysées. La susceptibilité des descendants à être colonisés par les bactéries AIEC sera également étudiée. Cette étude pourrait permettre de montrer l'importance de l'épigénétique dans la prédisposition à la colonisation par les AIEC et pourrait, en partie, expliquer l'incidence forte de la MC dans les pays industrialisés.

### **3. Quels sont les gènes et/ou voies cellulaires régulées par les HDACs d'intérêt impliqués dans le processus d'entrée des bactéries AIEC ?**

#### **a. Rôle de *GCNT1* dans la colonisation intestinale par les AIEC**

Grâce à une analyse transcriptomique sur des cellules Caco-2 « silencées » pour HDAC1 ou HDAC5, le gène *GCNT1* a pu être identifié comme régulé par ces 2 HDACs et impliqué dans le processus d'entrée des bactéries AIEC dans les CEIs *in vitro*. *GCNT1* code pour la glucosaminyl (N-acétyl) transférase 1, impliquée dans la synthèse de la ramification core 2 des O-glycanes de type mucines. Des modifications du niveau d'expression de cette enzyme pourraient altérer la composition du mucus mais également des glycosylations associées à des protéines ciblées par les Entérobactéries. Nous avons observé que les patients colonisés par les MAEC présentaient un plus fort niveau d'expression de *GCNT1* comparativement aux patients non colonisés par les Entérobactéries, que ce soit au moment de la chirurgie ou 6 mois après la résection iléocolique, confirmant les données *in vitro* et suggérant qu'un plus fort niveau d'expression de *GCNT1* favoriserait l'implantation des Entérobactéries au niveau de la muqueuse iléale des patients. Toutefois, les patients colonisés par des bactéries AIEC présentaient un niveau plus faible d'expression de *GCNT1* comparativement aux autres patients et nous avons observé, *in vitro*, que le niveau d'expression de *GCNT1* diminuait suite à l'infection par la souche AIEC LF82 (donnée non présentée). Il est à noter que nos résultats proviennent d'analyses transcriptomiques et qu'ils devront être validés par la quantification de la protéine GCNT1 *via* des analyses par western blot et des immunomarquages. Dans le cas où ces observations seraient validées, il serait probable que l'expression augmentée de *GCNT1* pourrait être favorable à l'implantation des Entérobactéries, mais qu'une fois implantées, l'infection par les bactéries AIEC diminuerait son expression, ce qui pourrait leur conférer un potentiel avantage qui resterait à identifier.

Des altérations de glycosylation des mucines formant la couche de mucus protectrice ont été liées au développement de l'inflammation intestinale et des souris déficientes pour *Gcnt1* sont plus sensibles à une colite induite au DSS (Kudelka *et al.*, 2020; Morosi *et al.*, 2021). L'utilisation de souris déficientes pour *Gcnt1* pourrait nous permettre de valider nos hypothèses et de déterminer si la capacité d'implantation de souches d'Entérobactéries non pathogènes est plus importante que la capacité d'implantation de souches AIEC dans ce modèle murin. De plus, il serait particulièrement intéressant

d'étudier l'état de glycosylation des mucines chez les patients colonisés ou non par des Entérobactéries et/ou par des AIEC et de mettre ces données en regard du niveau d'expression de *GCNT1*. Dans le cas où la faible expression de *GCNT1* serait associée à une diminution de la capacité d'implantation des Entérobactéries, le développement d'un inhibiteur de l'activité enzymatique de GCNT1 pourrait être envisagé. D'un point de vue clinique, il serait particulièrement intéressant d'utiliser cet inhibiteur chez les patients après la première chirurgie afin de limiter l'implantation d'Entérobactéries sur des régions saines de la muqueuse iléale. Cependant, de nombreuses études sont à mener afin de valider l'intérêt thérapeutique de cibler GCNT1 chez les patients atteints de MC. De plus, l'identification de cette cible potentielle repose sur un croisement de listes de gènes. En effet, la liste des gènes surexprimés suite au « silencing » de HDAC1 a été croisée à celle des gènes sous-exprimés suite au « silencing » de HDAC5. Même si cela a permis de mettre en évidence un gène d'intérêt particulier, nous avons décidé d'élargir l'étude *via* une approche de « Gene Ontology » afin d'identifier des voies cellulaires dérégulées suite au « silencing » de HDAC1 ou HDAC5 qui pourraient expliquer les phénotypes observés.

### **b. Identification de voies cellulaires impliquées dans l'entrée des AIEC dans les CEIs : analyse par « Gene Ontology » (GO)**

L'analyse par GO nous a permis d'identifier des voies ainsi que des gènes qui pourraient être impliqués dans le processus d'invasion des AIEC. Cependant, il est important de noter que des gènes clés pourraient ne pas être identifiés par cette approche. En effet, elle repose sur l'enrichissement de gènes impliqués dans des voies cellulaires, l'enrichissement étant uniquement identifié lorsque plusieurs gènes d'une même voie sont anormalement régulés. Dans le cas où un gène extrêmement important pour l'entrée des AIEC serait surexprimé, sans que les autres gènes de la même voie cellulaire ne le soient, il ne pourra pas être identifié par cette approche de GO. C'est pourquoi une étude plus approfondie des gènes dérégulés est requise dans le futur. Cependant, cette analyse nous a tout de même permis d'identifier des voies cellulaires d'intérêt qu'il semble important d'étudier. En effet, nous avons pu identifier le rôle de HDAC1 dans la régulation du cytosquelette d'actine mais également dans le contrôle de la réponse inflammatoire ainsi que le rôle de HDAC5 dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans le maintien de la perméabilité intestinale.

Le rôle de HDAC1 dans la régulation du cytosquelette d'actine a déjà été observé précédemment. En effet, il a été mis en évidence que le « silencing » de HDAC1 dans des cellules cancéreuses gastriques dérégulait l'expression et l'activation de protéines impliquées dans l'organisation de la tubuline et du cytosquelette. De manière plus globale, cela résultait en des altérations des microfilaments d'actine et des microtubules conduisant à un changement de morphologie des cellules, qui devenaient rondes, associée à une perte de pseudopodes (L. Lin *et al.*, 2015). Il semble donc important, à court terme, d'étudier la morphologie des cellules silencées pour HDAC1. Un arrondissement des cellules au niveau de l'épithélium pourrait altérer la cohésion intercellulaire et



favoriser l'implantation des bactéries AIEC. De plus, le changement de morphologie des cellules intestinales pourrait permettre d'exposer des protéines cellulaires, non identifiées à ce jour, favorisant l'attachement des bactéries (Dumych *et al.*, 2018). Concernant le rôle de HDAC1 dans la réponse inflammatoire, cela est cohérent avec de précédentes études où il a été observé *in vitro*, que HDAC1 était un régulateur de la réponse inflammatoire dépendante de IL-1 $\beta$  et que la délétion spécifique de *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEIs *in vivo* résultait en une inflammation intestinale de bas grade avec une augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires (Gonneaud *et al.*, 2014; Turgeon *et al.*, 2013, 2014).

L'implication de HDAC5 dans le contrôle de la perméabilité intestinale a déjà été suggérée. En effet, une augmentation de l'expression de *HDAC5* dans la muqueuse intestinale était associée à une augmentation de la perméabilité intestinale dans un modèle *in vivo* de septicémie (B. Li *et al.*, 2021). Pour confirmer que HDAC5 est impliqué dans la fonction barrière de l'intestin, la résistance électrique transépithéliale (TEER) ou la diffusion d'une molécule fluorescente pourraient être évaluées dans un système « Transwell » où les cellules formant la monocouche auraient été traitées avec du LMK-235 ou spécifiquement délétées pour *HDAC5* grâce au système CRISPR/Cas9. Aussi, à partir de tissus issus d'animaux spécifiquement délétés pour HDAC5 dans les CEIs ou traitées avec du LMK-235, la perméabilité intestinale sera évaluée *ex vivo* en mesurant le passage d'une molécule fluorescente à travers la muqueuse intestinale grâce au système des chambres de Ussing. Une vérification *in vivo* est également envisageable. Des souris seront traitées avec du LMK-235, un inhibiteur de HDAC5, par injection intrapéritonéale durant 5 jours. La perméabilité intestinale sera évaluée après administration par voie orale de Dextran 4kDa-FITC et mesure de la fluorescence dans le sang des animaux.

#### **4. Quel est le rôle des HDACs dans la régulation de l'inflammation intestinale ?**

De nombreuses études ont montré l'effet anti-inflammatoire des inhibiteurs de HDACs (Ali *et al.*, 2018; Glaubien *et al.*, 2006, 2008; C. Lee *et al.*, 2017; Simeoli *et al.*, 2017). Cependant, nos travaux montrent que l'inhibition des HDACs de classe I favorise l'implantation des bactéries AIEC ainsi que la réponse inflammatoire, ce qui semble contradictoire. Les inhibiteurs de HDACs ne ciblent pas qu'une seule HDAC en particulier, ils ciblent le plus souvent toutes les HDACs. Ceci pourrait expliquer que l'inhibition spécifique des HDACs de classe I mène à une augmentation de l'inflammation en contexte infectieux, ce qui ne serait probablement pas le cas avec un inhibiteur global des HDACs (SAHA ou TSA). Le rôle individuel de chacune des HDACs dans le contrôle de l'inflammation pourrait être étudié *via* le « silencing » des différentes HDACs suivi d'une analyse transcriptomique, qui permettra d'identifier d'éventuelles dérégulations des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. Enfin, il est important de garder en tête que l'effet anti-inflammatoire de l'inhibition des HDACs peut passer par la régulation de l'acétylation de protéines non histones comme des facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B.

Il est connu que le butyrate a un effet protecteur sur l'inflammation *via* son activité d'inhibiteur des HDACs (Chang *et al.*, 2014; G. Li *et al.*, 2021; Parada Venegas *et al.*, 2019). Toutefois, le mécanisme moléculaire menant à l'effet protecteur du butyrate n'a pas été totalement caractérisé. Nous avons observé que le « silencing » de HDAC1 menait à une dérégulation de l'expression de gènes de l'inflammation suggérant que son inhibition favoriserait la réponse inflammatoire, ce qui semble contradictoire avec l'effet bénéfique du butyrate sur l'inflammation. Il a été démontré que le butyrate perturbait la localisation nucléaire de HDAC5 tandis qu'une autre étude a montré que le butyrate atténuait l'hypertrophie cardiaque induite par l'angiotensine II chez le rat *via* l'inhibition de HDAC5 (Downes *et al.*, 2000; L. Zhang *et al.*, 2019). Ces données mettent en évidence que le butyrate peut directement impacter l'activité de HDAC5 et suggèrent que l'effet protecteur du butyrate sur l'inflammation pourrait potentiellement passer par l'inhibition de HDAC5. Pour mieux comprendre comment le butyrate régule l'inflammation, il serait intéressant, à moyen terme, de comparer l'effet du butyrate, qui est un inhibiteur global des HDACs, avec celui du MS-275, qui inhibe seulement les HDACs de classe I, sur la réponse inflammatoire en contexte infectieux *in vitro* et *in vivo*. Si l'effet anti-inflammatoire obtenu avec le butyrate n'est pas retrouvé avec le MS-275, cela signifiera que l'effet ne passe pas par les HDACs de classe I mais par les autres HDACs et potentiellement les HDACs de classe IIa. Enfin, il serait intéressant de déterminer si le butyrate montre toujours un effet anti-inflammatoire chez des souris déficientes pour *Hdac5* dans les CEIs, ce qui validerait le rôle crucial de HDAC5 dans le contrôle de l'inflammation par le butyrate *in vivo*.

### **5. Par quels mécanismes l'inhibition des HDACs de classe I prédispose-t-elle à la colonisation intestinale par les bactéries AIEC ?**

Nous avons observé que les souris traitées avec l'inhibiteur des HDACs de classe I MS-275 étaient plus susceptibles à l'infection par les bactéries AIEC. Dans un premier temps, il semble nécessaire de réitérer cette expérience avec des souris spécifiquement déficientes pour *Hdac1* dans les CEIs afin de valider que l'effet du MS-275 passe bien par l'inhibition de HDAC1 et non par l'inhibition des autres HDACs de classe I (HDAC2, HDAC3 et HDAC8). Le traitement inhibiteur étant administré avant l'infection, on peut imaginer que cela induise l'expression des gènes impliqués dans la régulation du cytosquelette d'actine comme cela a été observé suite au « silencing » de HDAC1 dans nos cellules en culture, rendant les cellules plus permissives à l'infection et favorisant donc l'implantation des bactéries AIEC. Aussi, nous avons identifié *GCNT1* comme un gène cible de HDAC1 qui favorise l'entrée des bactéries AIEC dans les cellules en culture. Il apparaît donc nécessaire d'étudier le niveau d'expression des gènes impliqués dans la régulation du cytosquelette et *GCNT1* chez les souris traitées avec le MS-275 afin de valider s'ils sont également dérégulés *in vivo* avec le MS-275. Cependant, d'autres études devront être menées afin d'identifier les mécanismes menant à la susceptibilité augmentée des animaux à la colonisation par les AIEC suite au traitement par le MS-275.

### **a. Induction d'une inflammation de bas grade par le MS-275 ?**

Une hypothèse serait que l'inhibiteur de HDACs de classe I induit une inflammation de bas grade favorable à l'implantation des AIEC. En effet, notre analyse transcriptomique a montré que l'inhibition de HDAC1 menait à la dérégulation de l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire créant une inflammation intestinale de bas grade. Il a été démontré dans des modèles *in vivo* qu'une inflammation iléale de bas grade favorisait l'expansion des Protéobactéries au sein du microbiote intestinal et la prolifération des AIEC au niveau de la muqueuse (Craven *et al.*, 2012). De plus, les Entérobactéries participent au maintien de l'inflammation intestinale et les AIEC peuvent utiliser des métabolites associés à l'inflammation (comme l'éthanolamine) ou modifier leur capacité métabolique en condition d'inflammation (en dégradant notamment la L-sérine), ce qui leur confèrent un avantage compétitif au sein du microbiote intestinal et favorise leur virulence (Baldelli *et al.*, 2021; Delmas *et al.*, 2019; Kitamoto *et al.*, 2020; Ormsby *et al.*, 2019; S. Zhang *et al.*, 2022). Ainsi, cela laisse supposer que l'inhibition de HDAC1 déclencherait une inflammation intestinale de bas grade, ce qui pourrait altérer la fonction barrière de l'intestin, et par conséquent favoriser l'implantation des Entérobactéries, ces effets pouvant potentiellement privilégier la sélection et le développement des bactéries AIEC. Une fois installées au niveau de la muqueuse, ces bactéries pathobiontes induiraient elles-mêmes des altérations de l'épigénome afin de favoriser leur propre colonisation et leur persistance.

### **b. Altération de la prolifération de l'épithélium intestinal par le MS-275 ?**

Il est connu que HDAC1 contrôle le cycle cellulaire et que la perte ou l'inhibition de HDAC1 le bloque (Senese *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2010; Zupkovitz *et al.*, 2010). Aussi, la perte de *Hdac1* et *Hdac2* au niveau intestinal chez des souris entraînait une perte des marqueurs des cellules souches *in vivo* (Zimmerlin *et al.*, 2015). Ainsi, le traitement des souris avec du MS-275 pourrait ralentir le renouvellement de l'épithélium intestinal ce qui limiterait l'élimination des bactéries AIEC qui auraient adhérees ou envahies les CEIs. Les souris traitées ou non avec le MS-275 pourraient recevoir du BrdU (Bromodeoxyuridine) afin de déterminer si le renouvellement cellulaire est impacté par l'inhibiteur. Aussi, il serait intéressant d'évaluer l'apoptose *in vitro* dans des cellules traitées avec du MS-275 et chez les souris traitées avec l'inhibiteur des HDACs de classe I. En effet, il a été démontré que les bactéries AIEC se fixaient préférentiellement aux résidus mannoses exposés à la surface des cellules apoptotiques, ce qui pourrait potentiellement constituer un point d'entrée dans l'épithélium intestinal pour les bactéries AIEC (Dumych *et al.*, 2018).

Des altérations de la différenciation cellulaire caractérisées par une réduction du nombre de cellules de Paneth et calciformes ont été rapportées chez des souris déficientes pour *Hdac1* et *Hdac2* spécifiquement dans les CEIs (Turgeon *et al.*, 2013). On pourrait imaginer que l'inhibition de HDAC1 induite par le traitement avec le MS-275 chez les souris impacterait la capacité de sécrétion de peptides antimicrobiens ou la formation de la couche de mucus ce qui favoriserait la colonisation intestinale par

les bactéries AIEC. Pour vérifier cela, en plus d'étudier le nombre de cellules de Paneth et calciformes par immunomarquage, des marquages du mucus (Muc2) ou de peptides antimicrobiens tels que Reg3 $\beta$  ou Reg3 $\gamma$  pourraient également être réalisés sur des coupes de côlon de souris traitées ou non avec du MS-275. Le pouvoir bactéricide de cryptes intestinales issues des souris traitées avec l'inhibiteur pourrait également être évalué afin de déterminer si l'inhibition *in vivo* de HDAC1 *via* le MS-275 altère le contrôle de la prolifération des bactéries AIEC.

## **6. Par quels mécanismes l'inhibition de HDAC5 limite-t-elle la colonisation intestinale par les bactéries AIEC ?**

Nous avons observé que le traitement des souris avec du LMK-235 favorisait l'élimination des bactéries AIEC rendant les animaux moins susceptibles à l'infection, ce qui démontre que l'activité de HDAC5 *in vivo* favorise la colonisation intestinale. Concernant les mécanismes moléculaires sous-jacents, l'analyse transcriptomique a révélé que HDAC5 régulait l'expression de gènes impliqués dans la formation des jonctions cellulaires. Ainsi, il est possible que l'inhibition de HDAC5 avec le traitement LMK-235 induise l'expression de ces gènes renforçant la perméabilité intestinale ce qui limiterait l'implantation des bactéries AIEC au niveau intestinal. Après avoir validé dans un premier temps la réduction de la susceptibilité à l'infection chez des souris spécifiquement délétées de *Hdac5* dans les CEIs, l'expression des gènes impliqués dans les jonctions cellulaires ainsi que la perméabilité intestinale seront étudiées chez ces mêmes souris ou chez des souris traitées avec du LMK-235.

HDAC5 est une HDAC de classe IIa qui transite en fonction de son état de phosphorylation entre le noyau et le cytoplasme des cellules (Mathias *et al.*, 2015; Seto & Yang, 2010). De plus, la régulation de l'expression des gènes par les HDACs de classe IIa se fait essentiellement *via* leur association au niveau nucléaire avec des complexes co-répresseurs comme SMRT/NCoR/HDAC3 ou avec des facteurs de transcription (Clocchiatti *et al.*, 2011; Fischle *et al.*, 2002; Hudson *et al.*, 2015). Ainsi, il serait intéressant d'étudier la localisation cellulaire de HDAC5 ainsi que son interaction avec ses partenaires protéiques suite au traitement de cellules ou d'animaux avec du LMK-235 afin de déterminer si l'effet bénéfique du LMK-235 dépend de la délocalisation cellulaire de HDAC5 ou par une inhibition de son interaction avec ses partenaires protéiques.

Le lien HDAC5/HIF-1 $\alpha$ /CEACAM6 pourrait également être étudié. En effet, HDAC5 contribue à la stabilisation et l'activité transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$  (S. Chen *et al.*, 2015; Seo *et al.*, 2009). Il a été montré *in vitro* et *in vivo* que HIF-1 $\alpha$  activait l'expression du gène *CEACAM6*, le récepteur avec lequel les bactéries AIEC interagissent préférentiellement (Denizot *et al.*, 2015). Ainsi, il serait judicieux d'analyser le niveau d'expression du gène *CEACAM6* dans l'intestin des souris CEABAC10 traitées avec le LMK-235. En effet, une hypothèse serait que l'inhibition de HDAC5 induirait une perte de HIF-

$1\alpha$  menant à une plus faible expression de *CEACAM6*. Cela pourrait expliquer la plus faible colonisation intestinale par les bactéries AIEC chez les souris traitées.

Le régime HF entraîne une diminution de l'activité HDAC globale, induit l'expression de HDAC5 et favorise la colonisation intestinale par les bactéries AIEC (Agus *et al.*, 2016; Martinez-Medina *et al.*, 2014). Grâce aux données que nous avons obtenues, il apparaît que le ciblage de HDAC5 représenterait une stratégie intéressante pour limiter la colonisation intestinale par les bactéries AIEC chez les patients atteints de MC. Pour confirmer le potentiel bénéfique de son blocage, il serait intéressant, à court terme, de réaliser une nouvelle étude *in vivo* où des souris seraient soumises à un régime conventionnel ou HF durant 4 semaines avant d'être traitées avec le LMK-235 et infectées avec la souche AIEC LF82. Avec cette expérience, nous espérons confirmer que le LMK-235 protège de l'infection les animaux nourris avec le régime contrôle. Par ailleurs, cette expérience permettrait également de déterminer si l'inhibition de HDAC5 serait suffisante pour contrer les effets néfastes du régime HF sur la colonisation intestinale.

## **II. Nouveau modèle d'étude de l'interaction AIEC-épithélium intestinal, Vill-*hCC6* : utilisations futures et évolution**

Au cours de la deuxième étude, le modèle Vill-*hCC6* a été caractérisé. Ce modèle permet de reproduire l'expression anormale de *CEACAM6* au niveau iléal, comme cela a été constaté chez les patients atteints de MC (Barnich *et al.*, 2007). Nous avons montré qu'il constituait un bon modèle préclinique de MC iléale grâce à la persistance augmentée des bactéries AIEC au niveau iléal chez les animaux transgéniques. En termes de perspectives, ce modèle permettra de mieux comprendre l'interaction AIEC-épithélium ainsi que le rôle des bactéries AIEC et de leur colonisation intestinale dans la physiopathologie de la MC. En effet, en plus de permettre d'étudier l'effet de l'infection et de la colonisation iléale sur la perméabilité intestinale et la réponse inflammatoire, ce modèle pourra également être utilisé, à moyen et long terme, dans les expériences *in vivo* que nous souhaitons réaliser pour confirmer et approfondir les résultats de la première étude. Aussi, des animaux transgéniques d'âges différents pourront être infectés avec la souche AIEC LF82 afin de déterminer s'il existe une fenêtre temporelle préférentielle pour l'implantation intestinale des bactéries AIEC. Les animaux transgéniques pourraient également être infectés avec une souche d'AIEC bioluminescente afin d'étudier le comportement des bactéries AIEC au sein du tractus digestif des animaux en temps réel et de manière non invasive. Il est envisagé d'analyser le microbiote intestinal des souris Vill-*hCC6* afin de déterminer si la surexpression de *CEACAM6* au niveau iléal impacte la composition générale du microbiote. De plus, il a été observé chez les souris CEABAC10 que la consommation d'un régime HF induisait une dysbiose, particulièrement caractérisée par un enrichissement en bactéries *E. coli* comparativement aux souris sauvages soumis au même régime (Martinez-Medina *et al.*, 2014). Ainsi, il

serait intéressant de réaliser les mêmes analyses de microbiote chez les souris Vill-*h*CC6 nourries avec le régime HF afin de voir si on observe les mêmes altérations. Si un enrichissement en *E. coli* est retrouvé, des caractérisations phénotypiques pourront être menées afin de déterminer si certaines souches présentent des caractéristiques d'adhésion et d'invasion propres aux AIEC, dans le but de mieux comprendre comment les AIEC ont été sélectionnés chez les patients atteints de MC.

Il serait également intéressant de faire évoluer ce modèle en générant des animaux transgéniques qui présenteraient un microbiote simplifié dont l'ensemble des espèces le constituant seraient connues, comme le microbiote « Altered Schaedler flora » composé de seulement 8 espèces bactériennes ou le microbiote Oligo-Mouse-Microbiota 12, comprenant 12 souches bactériennes (Brugiroux *et al.*, 2016; Wymore Brand *et al.*, 2015). En effet, la présence d'un microbiote restreint et totalement défini facilitera l'étude de l'interaction entre bactéries-hôte mais aussi l'interaction inter-bactéries ce qui permettra d'étudier et de comprendre le comportement des bactéries AIEC au sein du microbiote intestinal.

Des organoïdes intestinaux, représentant un modèle extrêmement intéressant pour l'étude des relations hôte-pathogène, pourront être dérivés des cryptes des souris Vill-*h*CC6. En effet, les différents types cellulaires présents dans l'épithélium intestinal *in vivo* sont présents dans les organoïdes et l'absence de cellules immunitaires facilite l'étude de l'interaction bactérie-épithélium. HDAC1 ou HDAC5 pourrait être inhibée dans les organoïdes et le niveau d'expression des gènes cibles précédemment identifiés pourra être analysé afin de confirmer nos résultats. Toutefois, une des limitations des organoïdes est que la lumière « intestinale » et le pôle apical des cellules sont localisés à l'intérieur de l'organoïde. Ainsi, l'infection des organoïdes est réalisée *via* des micro-injections de bactéries dans la lumière, cette technique étant très délicate à réaliser. Cependant, il a été démontré qu'en absence de matrice, la polarité des organoïdes pouvait s'inverser, exposant le pôle apical des cellules vers l'extérieur (Co *et al.*, 2019). Il est également possible de générer, à partir d'organoïdes en 3D, des monocouches d'organoïdes en 2D contenant l'ensemble des cellules différenciées de l'épithélium intestinal (Rahmani *et al.*, 2019). Ainsi, il est envisagé d'infecter des organoïdes présentant soit le pôle apical, soit le pôle basolatéral vers l'extérieur, ainsi que des monocouches d'organoïdes avec des bactéries AIEC. Grâce à des approches de microscopie confocale, cela permettra d'identifier le pôle cellulaire ainsi que les types cellulaires préférentiellement ciblés par les bactéries AIEC. On pourrait également envisager de traiter les organoïdes avec les inhibiteurs de HDACs afin de confirmer les phénotypes précédemment observés dans les autres modèles quant à l'entrée des AIEC dans les CEIs. Le potentiel de molécules inhibant l'adhésion et/ou l'invasion des bactéries AIEC à l'épithélium pourra également être évalué dans ce modèle d'organoïdes.



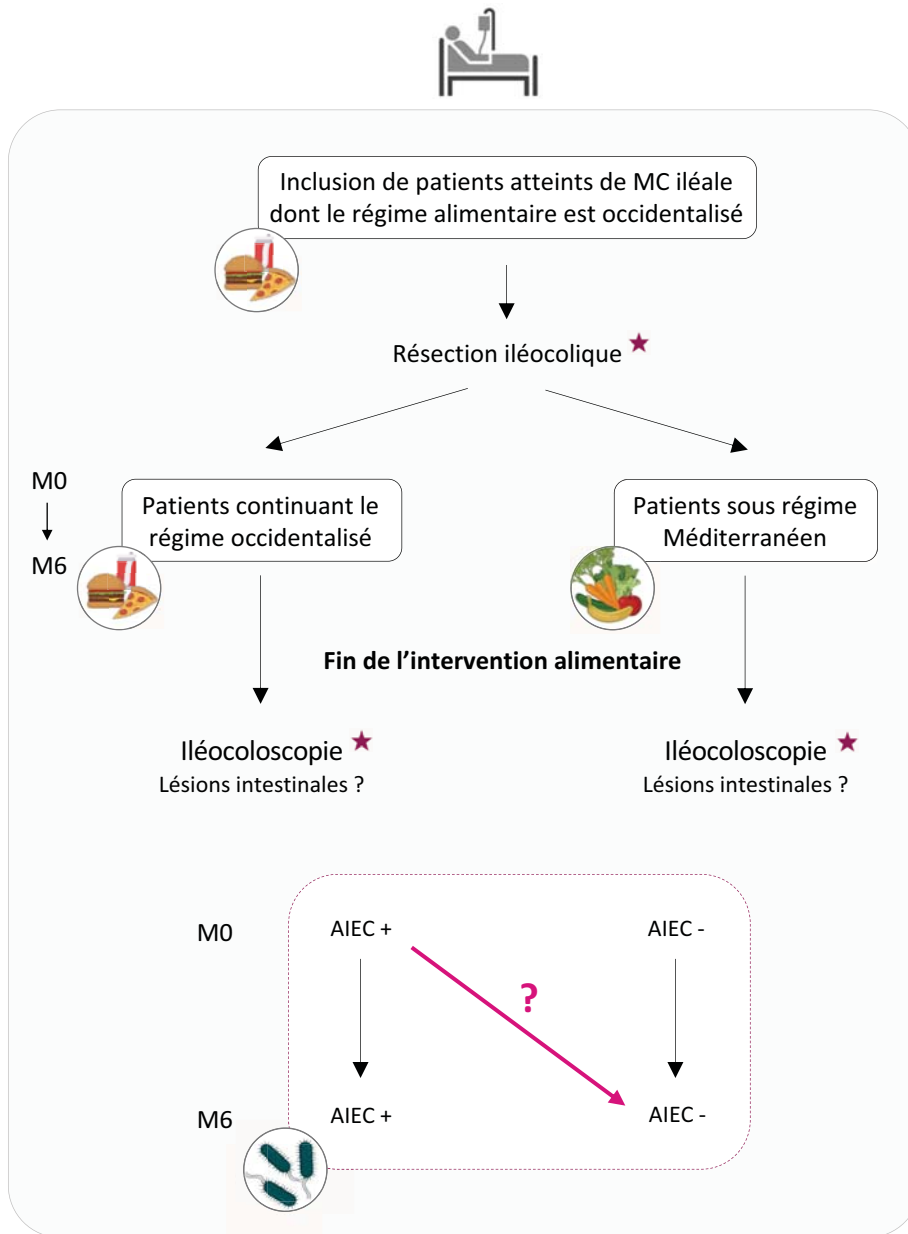
### III. Validation des cibles thérapeutiques en clinique

#### 1. Validation des données grâce à des études observationnelles chez les patients

Au cours de notre étude, nous avons eu la chance de pouvoir confirmer nos résultats avec des échantillons de muqueuse iléale issus des patients de la cohorte REMIND et de déterminer que le ratio d'expression HDAC1/HDAC5 pourrait être prédictif de la colonisation intestinale par les Entérobactéries et les bactéries AIEC. Toutefois, concernant ce ratio, son utilisation semble difficilement envisageable en clinique pour identifier des patients avec une susceptibilité accrue à être colonisés par les bactéries AIEC. En effet, en plus d'avoir accès à des biopsies iléales, il faudrait standardiser la valeur du ratio afin de déterminer l'amplitude de différence qui serait associée à un risque augmenté d'être porteur de bactéries AIEC. Pour cela, il faudrait travailler sur d'autres échantillons humains afin de confirmer le rôle du ratio et de déterminer sa valeur potentiellement prédictive.

Chez les patients, la résection iléocolique permet d'éliminer les segments trop impactés par la MC, entraînant une « remise à zéro » artificielle de la maladie. En étudiant la récurrence post-opératoire à 6 mois post-chirurgie, cela permet en réalité d'analyser les phases précoces de la MC. Ainsi, nous avons étudié le niveau d'expression de *GCNT1* chez des patients ne présentant pas ou présentant des formes précoces de lésions iléales 6 mois post-chirurgie. De manière intéressante, nous avons observé que *GCNT1* avait tendance à être plus exprimé chez les patients colonisés par des bactéries MAEC comparativement aux patients non colonisés par des Entérobactéries suggérant que *GCNT1* favoriserait l'implantation des Entérobactéries dans la muqueuse iléale. Il serait intéressant de suivre les patients à plus long terme, au-delà de 6 mois post-chirurgie. En effet, cela permettrait de pouvoir conclure plus clairement sur le lien entre expression de *GCNT1* et colonisation par les Entérobactéries et de voir si, sur une période plus longue, l'expression de *GCNT1* pourrait être liée à l'implantation des AIEC. Aussi, cela permettrait d'observer si les patients exprimant *GCNT1* à un plus fort niveau et présentant une plus forte charge d'Entérobactéries associées à la muqueuse iléale sont ceux qui rechutent le plus d'un point de vue endoscopique et clinique. Si tel est le cas, il pourrait être intéressant de développer des inhibiteurs spécifiques de *GCNT1* pour de futures thérapies ciblées destinées aux patients porteurs d'AIEC.

Actuellement, les stratégies thérapeutiques envisagées et évaluées pour limiter ou prévenir l'invasion de la muqueuse intestinale par les AIEC reposent sur l'utilisation d'antibiotiques (TEOREM, NCT02620007), la phagothérapie (EcoActive, NCT03808103), ou sur le recours à des molécules antagonistes de l'adhésine bactérienne FimH (Sibofimloc, NCT03943446) et à des levures probiotiques (Galtier *et al.*, 2017; Sivignon, de Vallée, *et al.*, 2015; Sivignon *et al.*, 2021; Sivignon, Yan, *et al.*, 2015). Les données expérimentales obtenues au cours de nos travaux suggèrent que le ciblage de HDAC5 ainsi qu'un rééquilibrage alimentaire pourraient être des approches intéressantes afin de limiter la colonisation intestinale par les bactéries AIEC chez les patients atteints de MC. Cependant, avant que ces stratégies ne soient proposées aux patients, de nombreuses validations *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires comme



★ Prélèvement d'un échantillon de muqueuse iléale

- Dénombrement des Entérobactéries associées à la muqueuse
- Évaluation de l'activité HDAC globale
- Recherche de la présence des AIEC
- Analyse transcriptomique

**Figure 65 : Schéma du protocole clinique proposé afin d'évaluer l'impact d'un régime Méditerranéen sur la colonisation par les AIEC chez les patients atteints de MC.**

Pour l'ensemble des analyses, des échantillons de muqueuse iléale seraient prélevés lors de la chirurgie ainsi qu'à la fin de l'intervention alimentaire, au cours d'une iléocoloscopie. L'objectif principal de cette étude serait de déterminer si les patients porteurs de bactéries AIEC au moment de la résection le sont toujours suite au changement d'alimentation.

cela l'a été proposé dans cette discussion. Concernant le ciblage de HDAC5, son bénéfice a déjà été démontré *in vivo*. En effet, son inhibition, *via* le LMK-235 ou son « silencing » *via* l'injection intraveineuse d'adénovirus codant pour un shARN-HDAC5, chez des souris souffrant de septicémie améliorait la survie des animaux, la perméabilité intestinale et réduisait la dysfonction intestinale (B. Li *et al.*, 2021). Toutefois, à terme, du fait des vastes rôles joués par les HDACs, il apparaît moins risqué de cibler un gène spécifiquement régulé par HDAC1 ou HDAC5, dont le rôle dans la colonisation intestinale aura été démontré.

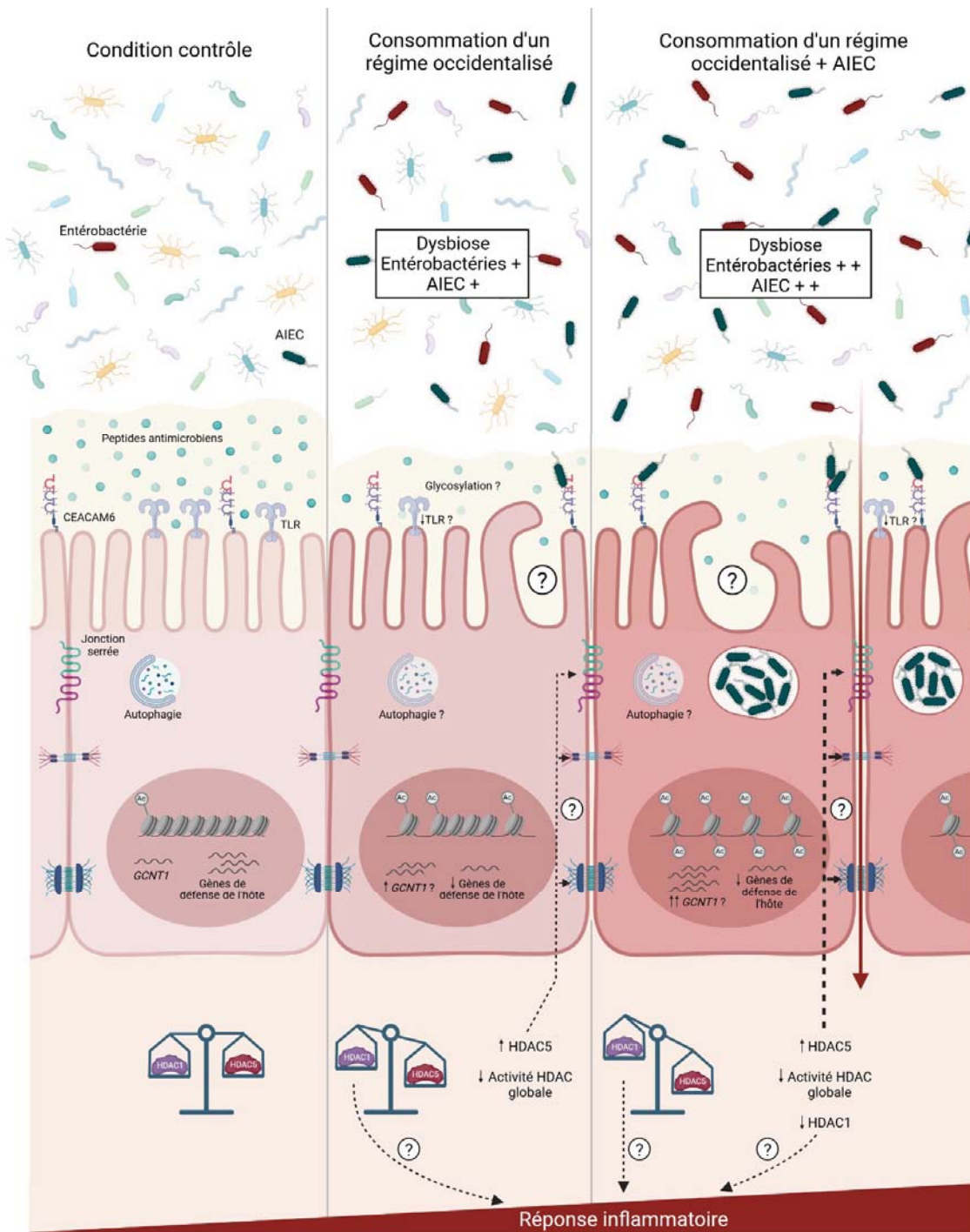
## **2. Proposition de protocole clinique interventionnel chez les patients pour limiter la colonisation intestinale par les AIEC**

Sur le long terme, la mise en place d'un nouveau protocole clinique semble également pertinente pour étudier le potentiel d'un rééquilibrage alimentaire. Pour des raisons éthiques, les effets délétères d'un régime enrichi en graisses ne peuvent pas être vérifiés chez des patients. Ainsi, l'idée serait d'inclure des patients atteints de MC iléale qui doivent subir une résection iléocolique et dont le régime alimentaire est occidentalisé et enrichi en graisses. Après la chirurgie, une partie des patients ne verrait pas son régime alimentaire être modifié (groupe contrôle), contrairement à l'autre partie des patients, dont le régime évoluerait vers un régime de type Méditerranéen (aliments riches en fibres associés à une réduction de la consommation de sucres et de produits transformés) durant plusieurs semaines afin d'étudier l'impact de ce régime sur la colonisation intestinale par les Entérobactéries et les AIEC ainsi que sur les modifications épigénétiques. Lors de la chirurgie, un échantillon de muqueuse iléale serait prélevé à partir de la pièce opératoire. À la fin de l'intervention alimentaire, les patients subiraient une iléocoloscopie durant laquelle les lésions intestinales seraient évaluées et une biopsie serait réalisée au niveau iléal (**Figure 65**). À partir des échantillons de muqueuse, la colonisation par les Entérobactéries et la présence des bactéries AIEC seraient étudiées. Nous souhaiterions déterminer si les patients du groupe contrôle sont davantage colonisés par les Entérobactéries et les AIEC comparativement aux patients qui auront subi le rééquilibrage alimentaire. De plus, nous souhaiterions évaluer dans le groupe « régime Méditerranéen », l'évolution de la colonisation par les Entérobactéries entre le moment de la chirurgie et la fin de l'étude, et déterminer si les patients qui étaient porteurs d'AIEC au moment de la résection, le sont toujours suite au changement d'alimentation. Aussi, la rechute clinique et endoscopique sera analysée chez les patients afin de déterminer si elle corrèle avec la colonisation intestinale. L'impact du régime Méditerranéen sur l'épigénome serait également étudié afin de révéler si d'éventuelles modulations sont associées avec la colonisation intestinale par les Entérobactéries et les AIEC. Ainsi, l'activité HDAC globale serait évaluée dans les échantillons. Toutefois, pour cela, l'extraction nucléaire doit être réalisée sur des tissus frais. Il faudra ainsi prendre en compte cette contrainte et mettre au point une méthode standardisée pour extraire les noyaux directement après le prélèvement de la muqueuse afin de pouvoir mesurer ultérieurement l'activité enzymatique chez les

patients. Une analyse transcriptomique serait réalisée sur ces échantillons afin d'analyser les niveaux d'expression de *HDAC1*, *HDAC5*, *GCNT1* et des autres gènes impliqués dans les voies régulées par les HDACs d'intérêt. Si une modification de l'activité HDAC était observée, il serait aussi intéressant d'étudier l'état de phosphorylation des HDACs ainsi que l'expression des protéines phosphatases sur les échantillons de muqueuse.

Ce protocole clinique permettrait d'identifier un potentiel bénéfice d'un rééquilibrage alimentaire vers un régime Méditerranéen et de déterminer si l'éventuelle limitation de la colonisation intestinale par les Entérobactéries et les AIEC passe par des modifications épigénétiques. Ainsi, si l'étude est concluante, il serait judicieux de stratifier les patients atteints de MC en fonction de leur statut de colonisation par les bactéries AIEC et de proposer un rééquilibrage alimentaire aux porteurs de ces bactéries pathobiontes afin de limiter la colonisation intestinale par les AIEC post-chirurgie et d'éventuelles rechutes. À terme, il semblerait également intéressant d'évaluer l'effet d'un rééquilibrage alimentaire associé au ciblage d'un gène cible sur l'épigénome et la colonisation intestinale par les Entérobactéries et les AIEC.

Ainsi, l'ensemble des travaux réalisés ouvre de nombreuses perspectives quant à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour limiter la colonisation intestinale par les bactéries AIEC. Même si de nombreuses études complémentaires restent encore à mener pour valider l'ensemble des résultats et des hypothèses, nous espérons qu'à plus long terme, ce travail contribuera à proposer des thérapies personnalisées aux patients porteurs d'AIEC.



**Figure 66 : Modèle proposé concernant le rôle de HDAC1, HDAC5 et du régime alimentaire de type occidental dans l'implantation des AIEC chez les patients atteints de MC.**

Suite à la consommation d'un régime de type occidental (HF), enrichi en graisses, l'expression de HDAC5 est induite, ce qui pourrait affaiblir les jonctions intercellulaires et altérer la fonction barrière de l'intestin. De plus, l'activité HDAC globale est diminuée avec le régime HF, l'inhibition de HDAC1 pouvant déréguler l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cytosquelette et la réponse inflammatoire. Ces modifications épigénétiques ont notamment été identifiées comme des conditions favorisant la colonisation intestinale par les Entérobactéries et les bactéries AIEC. La consommation du régime HF a également été associée à une répression de gènes impliqués dans l'expression de peptides antimicrobiens, le processus autophagique ou de gènes codant pour des récepteurs de l'immunité innée tels que les TLRs. Une fois implantées dans la muqueuse intestinale, les bactéries AIEC sont capables d'induire des modifications épigénétiques qui pourraient amplifier ces mécanismes, afin de favoriser leur propre colonisation.

## Conclusion générale

---

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de progresser dans la compréhension de l'interaction AIEC-épithélium intestinal en identifiant les régulateurs épigénétiques HDAC1 et HDAC5 comme des acteurs clés de la régulation de la colonisation intestinale par les Entérobactéries et les AIEC.

En effet, grâce à des modèles *in vitro* et *in vivo*, il a été observé que HDAC1 limitait la colonisation de la muqueuse intestinale par les AIEC tandis que HDAC5 la favorisait. Ces résultats ont pu être confirmés dans une large cohorte de patients, où il a été constaté que les niveaux d'expression de HDAC1 et HDAC5 étaient dérégulés, le ratio d'expression HDAC1/HDAC5 pouvant potentiellement être prédictif de la quantité d'Entérobactéries associées à la muqueuse iléale et du portage des AIEC. Concernant les mécanismes moléculaires sous-jacents de la régulation HDAC-dépendante de la colonisation intestinale par les AIEC, les analyses transcriptomiques ont révélé l'implication de HDAC1 dans le contrôle de la réponse inflammatoire et dans la régulation du cytosquelette d'actine ainsi que le rôle de HDAC5 dans la perméabilité paracellulaire. Nos résultats suggèrent également que le régime HF créerait un environnement propice à l'implantation des bactéries AIEC au sein de la muqueuse intestinale. En plus d'inhiber l'activité HDAC globale et d'induire l'expression de HDAC5, qui sont des conditions favorisant l'entrée des AIEC dans les CEIs, la consommation d'un régime HF inhibe l'expression de gènes impliqués dans la défense de l'hôte. De plus, nous avons observé que les AIEC, une fois implantées, pouvaient favoriser leur propre colonisation en inhibant l'activité HDAC globale ou en modulant l'expression de HDAC1 et HDAC5 (**Figure 66**).

La meilleure compréhension de la régulation de la colonisation intestinale par les Entérobactéries et les bactéries AIEC semblent orienter le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques vers un ciblage spécifique de HDAC5 et/ou un rééquilibrage alimentaire pour les patients atteints de MC porteurs d'AIEC.

Pour finir, les analyses complémentaires qui feront suite à ces travaux pourront être réalisées dans le modèle Vill-*h*CC6, que nous avons récemment caractérisé au laboratoire. En effet, en reproduisant l'expression iléale anormale de *CEACAM6*, comme cela a été observé chez les patients, ce modèle constitue un bon modèle préclinique de MC iléale.





# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

---

- Abubakar, I., Myhill, D., Aliyu, S. H., & Hunter, P. R. (2008). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques : A systematic review and meta-analysis. *Inflammatory Bowel Diseases*, *14*(3), 401-410. <https://doi.org/10.1002/ibd.20276>
- Adegbola, S. O., Sahnan, K., Warusavitarne, J., Hart, A., & Tozer, P. (2018). Anti-TNF Therapy in Crohn's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(8), 2244. <https://doi.org/10.3390/ijms19082244>
- Adenis, A., Colombel, J. F., Lecouffe, P., Wallaert, B., Hecquet, B., Marchandise, X., & Cortot, A. (1992). Increased pulmonary and intestinal permeability in Crohn's disease. *Gut*, *33*(5), 678-682.
- Adler, J., Rangwalla, S. C., Dwamena, B. A., & Higgins, P. D. R. (2011). The prognostic power of the NOD2 genotype for complicated Crohn's disease : A meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology*, *106*(4), 699-712. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.19>
- Agus, A., Denizot, J., Thévenot, J., Martinez-Medina, M., Massier, S., Sauvanet, P., Bernalier-Donadille, A., Denis, S., Hofman, P., Bonnet, R., Billard, E., & Barnich, N. (2016). Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. *Scientific Reports*, *6*(1), 19032. <https://doi.org/10.1038/srep19032>
- Agus, A., & Sokol, H. (2019). Tryptophan and metabolic syndrome, a new challenge for health. *Medecine Sciences: M/S*, *35*(3), 213-215. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019040>
- Ahluwalia, B., Moraes, L., Magnusson, M. K., & Öhman, L. (2018). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *53*(4), 379-389. <https://doi.org/10.1080/00365521.2018.1447597>
- Aida, I., Meddour, Y., Kadiri, H., Smara, M., Bousseloub, A., Kecili, L., Gamar, L., Belhocine, K., Boussafsaf, M.-A., Debzi, N., Aouichat-Bouguerra, S., & Chaib, S. (2018). T300A variant of AT16L1 gene in a cohort of Algerian Crohn disease patients. *Current Research in Translational Medicine*, *66*(1), 9-14. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2018.01.002>
- Ajayi, T. A., Innes, C. L., Grimm, S. A., Rai, P., Finethy, R., Coers, J., Wang, X., Bell, D. A., McGrath, J. A., Schurman, S. H., & Fessler, M. B. (2019). Crohn's disease IRGM risk alleles are associated with altered gene expression in human tissues. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *316*(1), G95-G105. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00196.2018>
- Al Nabhani, Z., Dietrich, G., Hugot, J.-P., & Barreau, F. (2017). Nod2 : The intestinal gate keeper. *PLoS Pathogens*, *13*(3), e1006177. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006177>
- Al Nabhani, Z., Lepage, P., Mauny, P., Montcuquet, N., Roy, M., Le Roux, K., Dussailant, M., Berrebi, D., Hugot, J.-P., & Barreau, F. (2016). Nod2 Deficiency Leads to a Specific and Transmissible Mucosa-associated Microbial Dysbiosis Which Is Independent of the Mucosal Barrier Defect. *Journal of Crohn's & Colitis*, *10*(12), 1428-1436. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw095>
- Alam, M. T., Amos, G. C. A., Murphy, A. R. J., Murch, S., Wellington, E. M. H., & Arasaradnam, R. P. (2020). Microbial imbalance in inflammatory bowel disease patients at different taxonomic levels. *Gut Pathogens*, *12*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0341-6>
- Albert-Bayo, M., Paracuellos, I., González-Castro, A. M., Rodríguez-Urrutia, A., Rodríguez-Lagunas, M. J., Alonso-Cotoner, C., Santos, J., & Vicario, M. (2019). Intestinal Mucosal Mast Cells : Key Modulators of Barrier Function and Homeostasis. *Cells*, *8*(2), 135. <https://doi.org/10.3390/cells8020135>
- Alenghat, T., Osborne, L. C., Saenz, S. A., Kobuley, D., Ziegler, C. G. K., Mullican, S. E., Choi, I., Grunberg, S., Sinha, R., Wynosky-Dolfi, M., Snyder, A., Giacomini, P. R., Joyce, K. L., Hoang, T. B., Bewtra, M., Brodsky, I. E., Sonnenberg,

- G. F., Bushman, F. D., Won, K.-J., ... Artis, D. (2013). Histone deacetylase 3 coordinates commensal-bacteria-dependent intestinal homeostasis. *Nature*, *504*(7478), 153-157. <https://doi.org/10.1038/nature12687>
- Algate, K., Haynes, D., Fitzsimmons, T., Romeo, O., Wagner, F., Holson, E., Reid, R., Fairlie, D., Bartold, P., & Cantley, M. (2020). Histone deacetylases 1 and 2 inhibition suppresses cytokine production and osteoclast bone resorption in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, *121*(1), 244-258. <https://doi.org/10.1002/jcb.29137>
- Ali, M. N., Chojjookhuu, N., Takagi, H., Srisowanna, N., Nguyen Nhat Huynh, M., Yamaguchi, Y., Synn Oo, P., Tin Htwe Kyaw, M., Sato, K., Yamaguchi, R., & Hishikawa, Y. (2018). The HDAC Inhibitor, SAHA, Prevents Colonic Inflammation by Suppressing Pro-inflammatory Cytokines and Chemokines in DSS-induced Colitis. *Acta Histochemica et Cytochemica*, *51*(1), 33-40. <https://doi.org/10.1267/ahc.17033>
- Alkaissi, L. Y., Winberg, M. E., Heil, S. D. S., Haapaniemi, S., Myrelid, P., Stange, E. F., Söderholm, J. D., & Keita, Å. V. (2020). Antagonism of Adherent Invasive E. coli LF82 With Human  $\alpha$ -defensin 5 in the Follicle-associated Epithelium of Patients With Ileal Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *27*(7), 1116-1127. <https://doi.org/10.1093/ibd/izaa315>
- Allaire, J. M., Crowley, S. M., Law, H. T., Chang, S.-Y., Ko, H.-J., & Vallance, B. A. (2018). The Intestinal Epithelium : Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends in Immunology*, *39*(9), 677-696. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.002>
- Allfrey, V. G., Faulkner, R., & Mirsky, A. E. (1964). ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *51*, 786-794. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.5.786>
- Alrafas, H. R., Busbee, P. B., Chitralla, K. N., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. (2020). Alterations in the Gut Microbiome and Suppression of Histone Deacetylases by Resveratrol Are Associated with Attenuation of Colonic Inflammation and Protection Against Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(6), 1796. <https://doi.org/10.3390/jcm9061796>
- Alrafas, H. R., Busbee, P. B., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. S. (2020). Resveratrol Downregulates miR-31 to Promote T Regulatory Cells during Prevention of TNBS-Induced Colitis. *Molecular Nutrition & Food Research*, *64*(1), e1900633. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900633>
- Al-Sadi, R., Boivin, M., & Ma, T. (2009). Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, *14*, 2765-2778.
- Al-Sadi, R., Guo, S., Ye, D., Rawat, M., & Ma, T. Y. (2016). TNF- $\alpha$  Modulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by NIK/IKK- $\alpha$  Axis Activation of the Canonical NF- $\kappa$ B Pathway. *The American Journal of Pathology*, *186*(5), 1151-1165. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.12.016>
- Al-Sadi, R. M., & Ma, T. Y. (2007). IL-1 $\beta$  causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *178*(7), 4641-4649. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4641>
- Amatullah, H., Fraschilla, I., Digumarthi, S., Huang, J., Adiliaghdam, F., Bonilla, G., Wong, L. P., Rivard, M.-E., Beauchamp, C., Mercier, V., Goyette, P., Sadreyev, R. I., Anthony, R. M., Rioux, J. D., & Jeffrey, K. L. (2022). Epigenetic reader SP140 loss of function drives Crohn's disease due to uncontrolled macrophage topoisomerases. *Cell*, *185*(17), 3232-3247.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.048>
- Ambatipudi, S., Cuenin, C., Hernandez-Vargas, H., Ghantous, A., Le Calvez-Kelm, F., Kaaks, R., Barrdahl, M., Boeing, H., Aleksandrova, K., Trichopoulou, A., Lagiou, P., Naska, A., Palli, D., Krogh, V., Polidoro, S., Tumino, R., Panico, S., Bueno-de-Mesquita, B., Peeters, P. H., ... Herceg, Z. (2016). Tobacco smoking-associated genome-wide DNA methylation changes in the EPIC study. *Epigenomics*, *8*(5), 599-618. <https://doi.org/10.2217/epi-2016-0001>
- Amenyah, S. D., Hughes, C. F., Ward, M., Rosborough, S., Deane, J., Thursby, S.-J., Walsh, C. P., Kok, D. E., Strain, J. J., McNulty, H., & Lees-Murdock, D. J. (2020). Influence of nutrients involved in one-carbon metabolism on DNA

- methylation in adults—A systematic review and meta-analysis. *Nutrition Reviews*, 78(8), 647-666. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuz094>
- Ananthakrishnan, A. N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(4), 4. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.34>
- Ananthakrishnan, A. N., Khalili, H., Higuchi, L. M., Bao, Y., Korzenik, J. R., Giovannucci, E. L., Richter, J. M., Fuchs, C. S., & Chan, A. T. (2012). Higher Predicted Vitamin D Status Is Associated With Reduced Risk of Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 142(3), 482-489. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.11.040>
- Ananthakrishnan, A. N., Khalili, H., Konijeti, G. G., Higuchi, L. M., de Silva, P., Korzenik, J. R., Fuchs, C. S., Willett, W. C., Richter, J. M., & Chan, A. T. (2013). A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 145(5), 970-977. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.07.050>
- Anderson, O. S., Sant, K. E., & Dolinoy, D. C. (2012). Nutrition and epigenetics : An interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism, and DNA methylation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(8), 853-859. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.003>
- Annese, T., Tamma, R., De Giorgis, M., & Ribatti, D. (2020). MicroRNAs Biogenesis, Functions and Role in Tumor Angiogenesis. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.581007>
- Annunziato, A. T. (2008). *DNA Packaging : Nucleosomes and Chromatin*. 1(1), 26.
- Ansari, I., Raddatz, G., Gutekunst, J., Ridnik, M., Cohen, D., Abu-Remaileh, M., Tuganbaev, T., Shapiro, H., Pikarsky, E., Elinav, E., Lyko, F., & Bergman, Y. (2020). The microbiota programs DNA methylation to control intestinal homeostasis and inflammation. *Nature Microbiology*, 5(4), 4. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0659-3>
- Aomatsu, T., Imaeda, H., Matsumoto, K., Kimura, E., Yoden, A., Tamai, H., Fujiyama, Y., Mizoguchi, E., & Andoh, A. (2011). Faecal chitinase 3-like-1 : A novel biomarker of disease activity in paediatric inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 34(8), 941-948. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04805.x>
- Arbibe, L., Kim, D. W., Batsche, E., Pedron, T., Mateescu, B., Muchardt, C., Parsot, C., & Sansonetti, P. J. (2007). An injected bacterial effector targets chromatin access for transcription factor NF-kappaB to alter transcription of host genes involved in immune responses. *Nature Immunology*, 8(1), 47-56. <https://doi.org/10.1038/ni1423>
- Arias-Alvarado, A., Aghayev, M., Ilchenko, S., Rachdaoui, N., Lepp, J., Tsai, T.-H., Zhang, G.-F., Previs, S., & Kasumov, T. (2021). Measuring acetyl-CoA and acetylated histone turnover in vivo : Effect of a high fat diet. *Analytical Biochemistry*, 615, 114067. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.114067>
- Arnaudo, A. M., & Garcia, B. A. (2013). Proteomic characterization of novel histone post-translational modifications. *Epigenetics & Chromatin*, 6, 24. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-6-24>
- Arnott, I. D., Kingstone, K., & Ghosh, S. (2000). Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 35(11), 1163-1169. <https://doi.org/10.1080/003655200750056637>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., ... Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174-180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- Assa, A., Vong, L., Pinnell, L. J., Rautava, J., Avitzur, N., Johnson-Henry, K. C., & Sherman, P. M. (2015). Vitamin D Deficiency Predisposes to Adherent-invasive Escherichia coli-induced Barrier Dysfunction and Experimental Colonic Injury. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(2), 297-306. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000282>
- Autschbach, F., Eisold, S., Hinz, U., Zinser, S., Linnebacher, M., Giese, T., Löffler, T., Büchler, M. W., & Schmidt, J. (2005). High prevalence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut*, 54(7), 944-949. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.045526>

- Bahari-Javan, S., Varbanov, H., Halder, R., Benito, E., Kaurani, L., Burkhardt, S., Anderson-Schmidt, H., Angheliescu, I., Budde, M., Stilling, R. M., Costa, J., Medina, J., Dietrich, D. E., Figge, C., Folkerts, H., Gade, K., Heilbronner, U., Koller, M., Konrad, C., ... Fischer, A. (2017). HDAC1 links early life stress to schizophrenia-like phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(23), E4686-E4694. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613842114>
- Bai, A. H. C., Wu, W. K. K., Xu, L., Wong, S. H., Go, M. Y., Chan, A. W. H., Harbord, M., Zhang, S., Chen, M., Wu, J. C. Y., Chan, M. W. Y., Chan, M. T. V., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., Yu, J., Cheng, A. S. L., & Ng, S. C. (2016). Dysregulated Lysine Acetyltransferase 2B Promotes Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis Through Transcriptional Repression of Interleukin-10. *Journal of Crohn's and Colitis*, *10*(6), 726-734. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw020>
- Baldelli, V., Scaldaferri, F., Putignani, L., & Del Chierico, F. (2021). The Role of Enterobacteriaceae in Gut Microbiota Dysbiosis in Inflammatory Bowel Diseases. *Microorganisms*, *9*(4), 697. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040697>
- Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., Rocha, K., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., Atadja, P., Seto, E., & Bhalla, K. (2005). Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90 : A novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(29), 26729-26734. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500186200>
- Bandyopadhyaya, A., Tsurumi, A., Maura, D., Jeffrey, K. L., & Rahme, L. G. (2016). A quorum-sensing signal promotes host tolerance training through HDAC1-mediated epigenetic reprogramming. *Nature Microbiology*, *1*, 16174. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.174>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, *21*(3), 3. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Bansal, A., Robles-Matos, N., Wang, P. Z., Condon, D. E., Joshi, A., & Pinney, S. E. (2019). In utero Bisphenol A Exposure Is Linked with Sex Specific Changes in the Transcriptome and Methylome of Human Amniocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *105*(2), 453-467. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz037>
- Bao, L., Diao, H., Dong, N., Su, X., Wang, B., Mo, Q., Yu, H., Wang, X., & Chen, C. (2016). Histone deacetylase inhibitor induces cell apoptosis and cycle arrest in lung cancer cells via mitochondrial injury and p53 up-acetylation. *Cell Biology and Toxicology*, *32*(6), 469-482. <https://doi.org/10.1007/s10565-016-9347-8>
- Barbalata, T., Zhang, L., Dulceanu, M. D., Stancu, C. S., Devaux, Y., Sima, A. V., & Niculescu, L. S. (2020). Regulation of microRNAs in high-fat diet induced hyperlipidemic hamsters. *Scientific Reports*, *10*(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77539-4>
- Barbara, G., Barbaro, M. R., Fuschi, D., Palombo, M., Falangone, F., Cremon, C., Marasco, G., & Stanghellini, V. (2021). Inflammatory and Microbiota-Related Regulation of the Intestinal Epithelial Barrier. *Frontiers in Nutrition*, *8*, 718356. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.718356>
- Bardai, F. H., & D'Mello, S. R. (2011). Selective Toxicity by HDAC3 in Neurons : Regulation by Akt and GSK3 $\beta$ . *The Journal of Neuroscience*, *31*(5), 1746-1751. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5704-10.2011>
- Barnich, N., Carvalho, F. A., Glasser, A.-L., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., Peeters, H., Bommelaer, G., Desreumaux, P., Colombel, J.-F., & Darfeuille-Michaud, A. (2007). CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(6), 1566-1574. <https://doi.org/10.1172/JCI30504>
- Barreau, F., Meinzer, U., Chareyre, F., Berrebi, D., Niwa-Kawakita, M., Dussaillant, M., Foligne, B., Ollendorff, V., Heyman, M., Bonacorsi, S., Lesuffleur, T., Sterkers, G., Giovannini, M., & Hugot, J.-P. (2007). CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *PLoS One*, *2*(6), e523. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000523>
- Barrón-Cabrera, E., Ramos-Lopez, O., González-Becerra, K., Riezu-Boj, J. I., Milagro, F. I., Martínez-López, E., & Martínez, J. A. (2019). Epigenetic Modifications as Outcomes of Exercise Interventions Related to Specific Metabolic Alterations : A Systematic Review. *Lifestyle Genomics*, *12*(1-6), 25-44. <https://doi.org/10.1159/000503289>



- Basic, M., Keubler, L. M., Buettner, M., Achard, M., Breves, G., Schröder, B., Smoczek, A., Jörns, A., Wedekind, D., Zschemisch, N. H., Günther, C., Neumann, D., Lienenklaus, S., Weiss, S., Hornef, M. W., Mähler, M., & Bleich, A. (2014). Norovirus triggered microbiota-driven mucosal inflammation in interleukin 10-deficient mice. *Inflammatory Bowel Diseases*, *20*(3), 431-443. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000441346.86827.ed>
- Baubec, T., Colombo, D. F., Wirbelauer, C., Schmidt, J., Burger, L., Krebs, A. R., Akalin, A., & Schübeler, D. (2015). Genomic profiling of DNA methyltransferases reveals a role for DNMT3B in genic methylation. *Nature*, *520*(7546), 243-247. <https://doi.org/10.1038/nature14176>
- Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., Orsi, R. H., Wiedmann, M., McDonough, P., Kim, S. G., Berg, D., Schukken, Y., Scherl, E., & Simpson, K. W. (2007). Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *The ISME Journal*, *1*(5), 403-418. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.52>
- Benjamin, J. L., Hedin, C. R. H., Koutsoumpas, A., Ng, S. C., McCarthy, N. E., Prescott, N. J., Pessoa-Lopes, P., Mathew, C. G., Sanderson, J., Hart, A. L., Kamm, M. A., Knight, S. C., Forbes, A., Stagg, A. J., Lindsay, J. O., & Whelan, K. (2012). Smokers with active Crohn's disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota. *Inflammatory Bowel Diseases*, *18*(6), 1092-1100. <https://doi.org/10.1002/ibd.21864>
- Benjamin, J., Makharia, G. K., Ahuja, V., Kalaivani, M., & Joshi, Y. K. (2008). Intestinal permeability and its association with the patient and disease characteristics in Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *14*(9), 1399-1405. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.1399>
- Béres, N. J., Szabó, D., Kocsis, D., Szűcs, D., Kiss, Z., Müller, K. E., Lendvai, G., Kiss, A., Arató, A., Sziksz, E., Vannay, Á., Szabó, A. J., & Veres, G. (2016). Role of Altered Expression of miR-146a, miR-155, and miR-122 in Pediatric Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *22*(2), 327-335. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000687>
- Bergeron, V., Grondin, V., Rajca, S., Maubert, M.-A., Pigneur, B., Thomas, G., Trugnan, G., Beaugerie, L., Cosnes, J., Masliah, J., Sokol, H., Seksik, P., & Bachelet, M. (2012). Current smoking differentially affects blood mononuclear cells from patients with Crohn's disease and ulcerative colitis : Relevance to its adverse role in the disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *18*(6), 1101-1111. <https://doi.org/10.1002/ibd.21889>
- Bermejo, F., Algaba, A., Guerra, I., Chaparro, M., De-La-Poza, G., Valer, P., Piqueras, B., Bermejo, A., García-Alonso, J., Pérez, M.-J., & Gisbert, J. P. (2013). Should we monitor vitamin B12 and folate levels in Crohn's disease patients? *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *48*(11), 1272-1277. <https://doi.org/10.3109/00365521.2013.836752>
- Bernstein, C. N., Rawsthorne, P., Cheang, M., & Blanchard, J. F. (2006). A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *The American Journal of Gastroenterology*, *101*(5), 993-1002. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00381.x>
- Bevins, C. L., Stange, E. F., & Wehkamp, J. (2009). Decreased Paneth cell defensin expression in ileal Crohn's disease is independent of inflammation, but linked to the NOD2 1007fs genotype. *Gut*, *58*(6), 882-883.
- Bhavsar, P., Ahmad, T., & Adcock, I. M. (2008). The role of histone deacetylases in asthma and allergic diseases. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *121*(3), 580-584. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.12.1156>
- Bian, C., Xu, C., Ruan, J., Lee, K. K., Burke, T. L., Tempel, W., Barysytė, D., Li, J., Wu, M., Zhou, B. O., Fleharty, B. E., Paulson, A., Allali-Hassani, A., Zhou, J.-Q., Mer, G., Grant, P. A., Workman, J. L., Zang, J., & Min, J. (2011). Sgf29 binds histone H3K4me2/3 and is required for SAGA complex recruitment and histone H3 acetylation. *The EMBO Journal*, *30*(14), 2829-2842. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.193>
- Bierne, H., & Cossart, P. (2002). InlB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and a growth factor. *Journal of Cell Science*, *115*(Pt 17), 3357-3367. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.17.3357>



- Bierne, H., & Hamon, M. (2020). Targeting host epigenetic machinery : The Listeria paradigm. *Cellular Microbiology*, 22(4), e13169. <https://doi.org/10.1111/cmi.13169>
- Bierne, H., Hamon, M., & Cossart, P. (2012). Epigenetics and Bacterial Infections. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12), a010272. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010272>
- Bilski, J., Brzozowski, B., Mazur-Bialy, A., Sliwowski, Z., & Brzozowski, T. (2014). The Role of Physical Exercise in Inflammatory Bowel Disease. *BioMed Research International*, 2014, 429031. <https://doi.org/10.1155/2014/429031>
- Bilski, J., Mazur-Bialy, A. I., Brzozowski, B., Magierowski, M., Jasnos, K., Krzysiek-Maczka, G., Urbanczyk, K., Ptak-Belowska, A., Zwolinska-Wcislo, M., Mach, T., & Brzozowski, T. (2015). Moderate exercise training attenuates the severity of experimental rodent colitis : The importance of crosstalk between adipose tissue and skeletal muscles. *Mediators of Inflammation*, 2015, 605071. <https://doi.org/10.1155/2015/605071>
- Bisanz, J. E., Upadhyay, V., Turnbaugh, J. A., Ly, K., & Turnbaugh, P. J. (2019). Meta-analysis reveals reproducible gut microbiome alterations in response to a high-fat diet. *Cell host & microbe*, 26(2), 265-272.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.013>
- Boada-Romero, E., Serramito-Gómez, I., Sacristán, M. P., Boone, D. L., Xavier, R. J., & Pimentel-Muiños, F. X. (2016). The T300A Crohn's disease risk polymorphism impairs function of the WD40 domain of ATG16L1. *Nature Communications*, 7, 11821. <https://doi.org/10.1038/ncomms11821>
- Bobrov, A. G., Kirillina, O., Fetherston, J. D., Miller, M. C., Burlison, J. A., & Perry, R. D. (2014). The Yersinia pestis Siderophore, Yersiniabactin, and the ZnuABC system both contribute to Zinc acquisition and the development of lethal septicemic plague in mice. *Molecular microbiology*, 93(4), 759-775. <https://doi.org/10.1111/mmi.12693>
- Borody, T. J., Bilkey, S., Wettstein, A. R., Leis, S., Pang, G., & Tye, S. (2007). Anti-mycobacterial therapy in Crohn's disease heals mucosa with longitudinal scars. *Digestive and Liver Disease*, 39(5), 438-444. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2007.01.008>
- Borody, T. J., Leis, S., Warren, E. F., & Surace, R. (2002). Treatment of severe Crohn's disease using antimycobacterial triple therapy—Approaching a cure? *Digestive and Liver Disease*, 34(1), 29-38. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(02\)80056-1](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(02)80056-1)
- Boschetti, G., Garnero, P., Moussata, D., Cuerq, C., Préaudat, C., Duclaux-Loras, R., Mialon, A., Drai, J., Flourié, B., & Nancey, S. (2015). Accuracies of serum and fecal S100 proteins (calprotectin and calgranulin C) to predict the response to TNF antagonists in patients with Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(2), 331-336. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000273>
- Boschetti, G., Laidet, M., Moussata, D., Stefanescu, C., Roblin, X., Phelip, G., Cotte, E., Passot, G., Francois, Y., Drai, J., Del Tedesco, E., Bouhnik, Y., Flourie, B., & Nancey, S. (2015). Levels of Fecal Calprotectin Are Associated With the Severity of Postoperative Endoscopic Recurrence in Asymptomatic Patients With Crohn's Disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 110(6), 865-872. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.30>
- Boudeau, J., Barnich, N., & Darfeuille-Michaud, A. (2001). Type 1 pili-mediated adherence of Escherichia coli strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 39(5), 1272-1284. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2001.02315.x>
- Boudeau, J., Glasser, A. L., Masseret, E., Joly, B., & Darfeuille-Michaud, A. (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. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.9.4499-4509.1999>
- Bradner, J. E., West, N., Grachan, M. L., Greenberg, E. F., Haggarty, S. J., Warnow, T., & Mazitschek, R. (2010). Chemical Phylogenetics of Histone Deacetylases. *Nature chemical biology*, 6(3), 238-243. <https://doi.org/10.1038/nchembio.313>

- Brant, S. R. (2011). Update on the heritability of inflammatory bowel disease : The importance of twin studies: *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(1), 1-5. <https://doi.org/10.1002/ibd.21385>
- Brest, P., Corcelle, E. A., Cesaro, A., Chargui, A., Belaïd, A., Klionsky, D. J., Vouret-Craviari, V., Hebuterne, X., Hofman, P., & Mograbi, B. (2010). Autophagy and Crohn's Disease : At the Crossroads of Infection, Inflammation, Immunity, and Cancer. *Current molecular medicine*, 10(5), 486-502.
- Bretin, A., Carrière, J., Dalmaso, G., Bergougnoux, A., B'chir, W., Maurin, A.-C., Müller, S., Seibold, F., Barnich, N., Bruhat, A., Darfeuille-Michaud, A., & Nguyen, H. T. T. (2016). Activation of the EIF2AK4-EIF2A/eIF2 $\alpha$ -ATF4 pathway triggers autophagy response to Crohn disease-associated adherent-invasive Escherichia coli infection. *Autophagy*, 12(5), 770-783. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1156823>
- Bretin, A., Lucas, C., Larabi, A., Dalmaso, G., Billard, E., Barnich, N., Bonnet, R., & Nguyen, H. T. T. (2018). AIEC infection triggers modification of gut microbiota composition in genetically predisposed mice, contributing to intestinal inflammation. *Scientific Reports*, 8, 12301. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30055-y>
- Bringer, M.-A., Billard, E., Glasser, A.-L., Colombel, J.-F., & Darfeuille-Michaud, A. (2012). Replication of Crohn's disease-associated AIEC within macrophages is dependent on TNF- $\alpha$  secretion. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 92(3), 411-419. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.156>
- Britton, G. J., Contijoch, E. J., Mogno, I., Vennaro, O. H., Llewellyn, S. R., Ng, R., Li, Z., Mortha, A., Merad, M., Das, A., Gevers, D., McGovern, D. P. B., Singh, N., Braun, J., Jacobs, J. P., Clemente, J. C., Grinspan, A., Sands, B. E., Colombel, J.-F., ... Faith, J. J. (2019). Microbiotas from Humans with Inflammatory Bowel Disease Alter the Balance of Gut Th17 and ROR $\gamma$ t+ Regulatory T Cells and Exacerbate Colitis in Mice. *Immunity*, 50(1), 212-224.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.015>
- Bruewer, M., Luegering, A., Kucharzik, T., Parkos, C. A., Madara, J. L., Hopkins, A. M., & Nusrat, A. (2003). Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(11), 6164-6172. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.6164>
- Brugiroux, S., Beutler, M., Pfann, C., Garzetti, D., Ruscheweyh, H.-J., Ring, D., Diehl, M., Herp, S., Lötscher, Y., Hussain, S., Bunk, B., Pukall, R., Huson, D. H., Münch, P. C., McHardy, A. C., McCoy, K. D., Macpherson, A. J., Loy, A., Clavel, T., ... Stecher, B. (2016). Genome-guided design of a defined mouse microbiota that confers colonization resistance against Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Nature Microbiology*, 2, 16215. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.215>
- Buhner, S. (2006). Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease : Role of CARD15 3020insC mutation? *Gut*, 55(3), 342-347. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.065557>
- Buisson, A., Chevaux, J.-B., Allen, P. B., Bommelaer, G., & Peyrin-Biroulet, L. (2012). Review article : The natural history of postoperative Crohn's disease recurrence. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 35(6), 625-633. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2012.05002.x>
- Buisson, A., Sokol, H., Hammoudi, N., Nancey, S., Treton, X., Nachury, M., Fumery, M., Hébuterne, X., Rodrigues, M., Hugot, J.-P., Boschetti, G., Stefanescu, C., Wils, P., Seksik, P., Le Bourhis, L., Bezault, M., Sauvanet, P., Pereira, B., Allez, M., ... Remind study group. (2022). Role of adherent and invasive Escherichia coli in Crohn's disease : Lessons from the postoperative recurrence model. *Gut*, gutjnl-2021-325971. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-325971>
- Buisson, A., Vazeille, E., Minet-Quinard, R., Goutte, M., Bouvier, D., Goutorbe, F., Pereira, B., Barnich, N., & Bommelaer, G. (2016). Faecal chitinase 3-like 1 is a reliable marker as accurate as faecal calprotectin in detecting endoscopic activity in adult patients with inflammatory bowel diseases. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 43(10), 1069-1079. <https://doi.org/10.1111/apt.13585>
- Buisson, Douadi, Ouchchane, Goutte, Hugot, Dubois, Minet-Quinard, Bouvier, Bommelaer, Vazeille, & Barnich. (2019). Macrophages Inability to Mediate Adherent-Invasive E. coli Replication is Linked to Autophagy in Crohn's Disease Patients. *Cells*, 8(11), 1394. <https://doi.org/10.3390/cells8111394>

- Burton, P. R., Clayton, D. G., Cardon, L. R., Craddock, N., Deloukas, P., Duncanson, A., Kwiatkowski, D. P., McCarthy, M. I., Ouwehand, W. H., Samani, N. J., Todd, J. A., Donnelly, P., Barrett, J. C., Burton, P. R., Davison, D., Donnelly, P., Easton, D., Evans, D., Leung, H.-T., ... Primary Investigators. (2007). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, *447*(7145), 7145. <https://doi.org/10.1038/nature05911>
- Cadwell, K., Liu, J., Brown, S. L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J., Kishi, C., KC, W., Carrero, J. A., Hunt, S., Stone, C., Brunt, E. M., Xavier, R. J., Sleckman, B. P., Li, E., Mizushima, N., Stappenbeck, T. S., & Virgin, H. W. (2008). A unique role for autophagy and Atg16L1 in Paneth cells in murine and human intestine. *Nature*, *456*(7219), 259-263. <https://doi.org/10.1038/nature07416>
- Cadwell, K., Patel, K. K., Maloney, N. S., Liu, T.-C., Ng, A. C. Y., Storer, C. E., Head, R. D., Xavier, R., Stappenbeck, T. S., & Virgin, H. W. (2010). Virus-Plus-Susceptibility Gene Interaction Determines Crohn's Disease Gene Atg16L1 Phenotypes in Intestine. *Cell*, *141*(7), 1135-1145. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.009>
- Calao, M., Burny, A., Quivy, V., Dekoninck, A., & Van Lint, C. (2008). A pervasive role of histone acetyltransferases and deacetylases in an NF-kappaB-signaling code. *Trends in Biochemical Sciences*, *33*(7), 339-349. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.04.015>
- Camprubí-Font, C., Bustamante, P., Vidal, R. M., O'Brien, C. L., Barnich, N., & Martínez-Medina, M. (2020). Study of a classification algorithm for AIEC identification in geographically distinct E. coli strains. *Scientific Reports*, *10*, 8094. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64894-5>
- Camprubí-Font, C., Lopez-Siles, M., Ferrer-Guixeras, M., Niubó-Carulla, L., Abellà-Ametller, C., Garcia-Gil, L. J., & Martínez-Medina, M. (2018). Comparative genomics reveals new single-nucleotide polymorphisms that can assist in identification of adherent-invasive Escherichia coli. *Scientific Reports*, *8*, 2695. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20843-x>
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., & Burcelin, R. (2008). Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes*, *57*(6), 1470-1481. <https://doi.org/10.2337/db07-1403>
- Cantley, M. D., Fairlie, D. P., Bartold, P. M., Marino, V., Gupta, P. K., & Haynes, D. R. (2015). Inhibiting histone deacetylase 1 suppresses both inflammation and bone loss in arthritis. *Rheumatology*, *54*(9), 1713-1723. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kev022>
- Cantorna, M. T. (2010). Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. *The Proceedings of the Nutrition Society*, *69*(3), 286-289. <https://doi.org/10.1017/S0029665110001722>
- Cao, Z., Conway, K. L., Heath, R. J., Rush, J. S., Leshchiner, E. S., Ramirez-Ortiz, Z. G., Nedelsky, N. B., Huang, H., Ng, A., Gardet, A., Cheng, S.-C., Shamji, A. F., Rioux, J. D., Wijmenga, C., Netea, M. G., Means, T. K., Daly, M. J., & Xavier, R. J. (2015). The Ubiquitin Ligase TRIM62 Regulates CARD9-Mediated Anti-Fungal Immunity and Intestinal Inflammation. *Immunity*, *43*(4), 715-726. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.10.005>
- Caron, C., Boyault, C., & Khochbin, S. (2005). Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination : Role in the control of protein stability. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *27*(4), 408-415. <https://doi.org/10.1002/bies.20210>
- Carrer, A., Parris, J. L. D., Trefely, S., Henry, R. A., Montgomery, D. C., Torres, A., Viola, J. M., Kuo, Y.-M., Blair, I. A., Meier, J. L., Andrews, A. J., Snyder, N. W., & Wellen, K. E. (2017). Impact of a High-fat Diet on Tissue Acyl-CoA and Histone Acetylation Levels. *The Journal of Biological Chemistry*, *292*(8), 3312-3322. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.750620>
- Carvalho, F. A., Barnich, N., Sauvanet, P., Darcha, C., Gelot, A., & Darfeuille-Michaud, A. (2008). Crohn's disease-associated Escherichia coli LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin. *Inflammatory Bowel Diseases*, *14*(8), 1051-1060. <https://doi.org/10.1002/ibd.20423>

- Carvalho, F. A., Barnich, N., Sivignon, A., Darcha, C., Chan, C. H. F., Stanners, C. P., & Darfeuille-Michaud, A. (2009). Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(10), 2179-2189. <https://doi.org/10.1084/jem.20090741>
- Cerf-Bensussan, N., & Gaboriau-Routhiau, V. (2010). The immune system and the gut microbiota: Friends or foes? *Nature Reviews Immunology*, 10(10), 10. <https://doi.org/10.1038/nri2850>
- Chakravarty, S., Bhat, U. A., Reddy, R. G., Gupta, P., & Kumar, A. (2014). Histone Deacetylase Inhibitors and Psychiatric Disorders. In *Epigenetics in Psychiatry* (p. 515-544). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417114-5.00025-5>
- Chan, C. H. F., & Stanners, C. P. (2004). Novel mouse model for carcinoembryonic antigen-based therapy. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 9(6), 775-785. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.03.009>
- Chandran, A., Antony, C., Jose, L., Mundayoor, S., Natarajan, K., & Kumar, R. A. (2015). Mycobacterium tuberculosis Infection Induces HDAC1-Mediated Suppression of IL-12B Gene Expression in Macrophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 90. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00090>
- Chang, P. V., Hao, L., Offermanns, S., & Medzhitov, R. (2014). The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(6), 2247-2252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322269111>
- Chapuy, L., Bsati, M., Sarkizova, S., Rubio, M., Therrien, A., Wassef, E., Bouin, M., Orlicka, K., Weber, A., Hacohen, N., Villani, A.-C., & Sarfati, M. (2019). Two distinct colonic CD14<sup>+</sup> subsets characterized by single-cell RNA profiling in Crohn's disease. *Mucosal Immunology*, 12(3), 3. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0126-0>
- Chassaing, B., Compher, C., Bonhomme, B., Liu, Q., Tian, Y., Walters, W., Nessel, L., Delaroque, C., Hao, F., Gershuni, V., Chau, L., Ni, J., Bewtra, M., Albenberg, L., Bretin, A., McKeever, L., Ley, R. E., Patterson, A. D., Wu, G. D., ... Lewis, J. D. (2022). Randomized Controlled-Feeding Study of Dietary Emulsifier Carboxymethylcellulose Reveals Detrimental Impacts on the Gut Microbiota and Metabolome. *Gastroenterology*, 162(3), 743-756. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.11.006>
- Chassaing, B., Etienne-Mesmin, L., Bonnet, R., & Darfeuille-Michaud, A. (2013). Bile salts induce long polar fimbriae expression favouring Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* interaction with Peyer's patches. *Environmental Microbiology*, 15(2), 355-371. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02824.x>
- Chassaing, B., & Gewirtz, A. T. (2018). Mice harboring pathobiont-free microbiota do not develop intestinal inflammation that normally results from an innate immune deficiency. *PLoS ONE*, 13(4), e0195310. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195310>
- Chassaing, B., Koren, O., Carvalho, F. A., Ley, R. E., & Gewirtz, A. T. (2014). AIEC Pathobiont Instigates Chronic colitis in Susceptible Hosts by Altering Microbiota composition. *Gut*, 63(7), 1069-1080. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-304909>
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J., Poole, A., Srinivasan, S., Ley, R. E., & Gewirtz, A. T. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*, 519(7541), 92-96. <https://doi.org/10.1038/nature14232>
- Chassaing, B., Rolhion, N., de Vallée, A., Salim, S. Y., Prorok-Hamon, M., Neut, C., Campbell, B. J., Söderholm, J. D., Hugot, J.-P., Colombel, J.-F., & Darfeuille-Michaud, A. (2011). Crohn disease-associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(3), 966-975. <https://doi.org/10.1172/JCI44632>



- Chassaing, B., Srinivasan, G., Delgado, M. A., Young, A. N., Gewirtz, A. T., & Vijay-Kumar, M. (2012). Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. *PLoS One*, *7*(9), e44328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044328>
- Chassaing, B., Van de Wiele, T., De Bodt, J., Marzorati, M., & Gewirtz, A. T. (2017). Dietary emulsifiers directly alter human microbiota composition and gene expression ex vivo potentiating intestinal inflammation. *Gut*, *66*(8), 1414-1427. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313099>
- Chauhan, S., Mandell, M. A., & Deretic, V. (2015). IRGM governs the core autophagy machinery to conduct antimicrobial defense. *Molecular cell*, *58*(3), 507-521. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.03.020>
- Chehoud, C., Albenberg, L. G., Judge, C., Hoffmann, C., Grunberg, S., Bittinger, K., Baldassano, R. N., Lewis, J. D., Bushman, F. D., & Wu, G. D. (2015). Fungal Signature in the Gut Microbiota of Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *21*(8), 1948-1956. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000454>
- Chen, C.-C., Pekow, J., Llado, V., Kanneganti, M., Lau, C. W., Mizoguchi, A., Mino-Kenudson, M., Bissonnette, M., & Mizoguchi, E. (2011). Chitinase 3-Like-1 Expression in Colonic Epithelial Cells as a Potentially Novel Marker for Colitis-Associated Neoplasia. *The American Journal of Pathology*, *179*(3), 1494-1503. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.05.038>
- Chen, D., Liu, J., Zhao, H.-Y., Chen, Y.-P., Xiang, Z., & Jin, X. (2016). Plasma long noncoding RNA expression profile identified by microarray in patients with Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*, *22*(19), 4716-4731. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i19.4716>
- Chen, M., Li, Q., Cao, N., Deng, Y., Li, L., Zhao, Q., Wu, M., & Ye, M. (2019). Profiling of histone 3 lysine 27 acetylation reveals its role in a chronic DSS-induced colitis mouse model. *Molecular Omics*, *15*(4), 296-307. <https://doi.org/10.1039/C9MO00070D>
- Chen, P., Zhou, G., Lin, J., Li, L., Zeng, Z., Chen, M., & Zhang, S. (2020). Serum Biomarkers for Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Medicine*, *7*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2020.00123>
- Chen, P., Zhu, H., Mao, Y., Zhuo, M., Yu, Y., Chen, M., Zhao, Q., Li, L., Wu, M., & Ye, M. (2021). SETD8 involved in the progression of inflammatory bowel disease via epigenetically regulating p62 expression. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *36*(10), 2850-2863. <https://doi.org/10.1111/jgh.15550>
- Chen, Q., Yan, M., Cao, Z., Li, X., Zhang, Y., Shi, J., Feng, G., Peng, H., Zhang, X., Zhang, Y., Qian, J., Duan, E., Zhai, Q., & Zhou, Q. (2016). Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science*, *351*(6271), 397-400. <https://doi.org/10.1126/science.aad7977>
- Chen, Q.-Q., Yan, L., & Wan, J. (2014). Select a suitable treatment strategy for Crohn's disease : Step-up or top-down. *EXCLI Journal*, *13*, 111-122.
- Chen, S., Yin, C., Lao, T., Liang, D., He, D., Wang, C., & Sang, N. (2015). AMPK-HDAC5 pathway facilitates nuclear accumulation of HIF-1 $\alpha$  and functional activation of HIF-1 by deacetylating Hsp70 in the cytosol. *Cell Cycle*, *14*(15), 2520-2536. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1055426>
- Chen, X., Guan, X., Peng, X., Cui, Z., Luan, C., & Guo, X. (2015). Acetylation of lysine 9 on histone H3 is associated with increased pro-inflammatory cytokine release in a cigarette smoke-induced rat model through HDAC1 depression. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, *64*(7), 513-526. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0832-y>
- Chen, Y., Huang, P., Ai, W., Li, X., Guo, W., Zhang, J., & Yang, J. (2012). Histone deacetylase activity is decreased in peripheral blood monocytes in patients with COPD. *Journal of Inflammation (London, England)*, *9*, 10. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-9-10>
- Chen, Y.-C., Hsiao, C.-C., Chen, C.-J., Chao, T.-Y., Leung, S.-Y., Liu, S.-F., Wang, C.-C., Wang, T.-Y., Chang, J.-C., Wu, C.-C., Lin, A.-S., Wang, Y.-H., & Lin, M.-C. (2014). Aberrant Toll-like receptor 2 promoter methylation in blood

- cells from patients with pulmonary tuberculosis. *The Journal of Infection*, 69(6), 546-557. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.08.014>
- Chervy, M., Barnich, N., & Denizot, J. (2020). Adherent-Invasive E. coli : Update on the Lifestyle of a Troublemaker in Crohn's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3734. <https://doi.org/10.3390/ijms21103734>
- Chervy, M., Sivignon, A., Dambrine, F., Buisson, A., Sauvanet, P., Godfraind, C., Allez, M., Le Bourhis, L., The Remind Group, Barnich, N., & Denizot, J. (2022). Epigenetic master regulators HDAC1 and HDAC5 control pathobiont Enterobacteria colonization in ileal mucosa of Crohn's disease patients. *Gut Microbes*, 14(1), 2127444. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2127444>
- Chiba, M., Nakane, K., & Komatsu, M. (2019). Westernized Diet is the Most Ubiquitous Environmental Factor in Inflammatory Bowel Disease. *The Permanente Journal*, 23, 18-107. <https://doi.org/10.7812/TPP/18-107>
- Chiodini, R. J., Dowd, S. E., Davis, B., Galandiuk, S., Chamberlin, W. M., Kuenstner, J. T., McCallum, R. W., & Zhang, J. (2013). Crohn's disease may be differentiated into 2 distinct biotypes based on the detection of bacterial genomic sequences and virulence genes within submucosal tissues. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 47(7), 612-620. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31827b4f94>
- Cho, Y. H., Renouf, M. J., Omotoso, O., & McPhee, J. B. (2022). Inflammatory bowel disease-associated adherent-invasive Escherichia coli have elevated host-defense peptide resistance. *FEMS Microbiology Letters*, fnac098. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnac098>
- Choi, J., Kwon, H. J., Yoon, B., Kim, J., Han, S. U., Joo, H. J., & Kim, D. (2001). Expression Profile of Histone Deacetylase 1 in Gastric Cancer Tissues. *Japanese Journal of Cancer Research : Gann*, 92(12), 1300-1304. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2001.tb02153.x>
- Chouliaras, L., van den Hove, D. L. A., Kenis, G., van Draanen, M., Hof, P. R., van Os, J., Steinbusch, H. W. M., Schmitz, C., & Rutten, B. P. F. (2013). Histone Deacetylase 2 in the Mouse Hippocampus : Attenuation of Age-Related Increase by Caloric Restriction. *Current Alzheimer research*, 10(8), 868-876.
- Christ, A., Lauterbach, M., & Latz, E. (2019). Western Diet and the Immune System : An Inflammatory Connection. *Immunity*, 51(5), 794-811. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.020>
- Clocchiatti, A., Florean, C., & Brancolini, C. (2011). Class IIa HDACs : From important roles in differentiation to possible implications in tumorigenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(9), 1833-1846. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01321.x>
- Clooney, A. G., Sutton, T. D. S., Shkoporov, A. N., Holohan, R. K., Daly, K. M., O'Regan, O., Ryan, F. J., Draper, L. A., Plevy, S. E., Ross, R. P., & Hill, C. (2019). Whole-Virome Analysis Sheds Light on Viral Dark Matter in Inflammatory Bowel Disease. *Cell Host & Microbe*, 26(6), 764-778.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.10.009>
- Co, J. Y., Margalef-Català, M., Li, X., Mah, A. T., Kuo, C. J., Monack, D. M., & Amieva, M. R. (2019). Controlling Epithelial Polarity : A Human Enteroid Model for Host-Pathogen Interactions. *Cell Reports*, 26(9), 2509-2520.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.108>
- Cole, J., Angyal, A., Emes, R. D., Mitchell, T. J., Dickman, M. J., & Dockrell, D. H. (2021). Pneumolysin Is Responsible for Differential Gene Expression and Modifications in the Epigenetic Landscape of Primary Monocyte Derived Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 12, 573266. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.573266>
- Connor, M., Arbibe, L., & Hamon, M. (2019). Customizing Host Chromatin : A Bacterial Tale. *Microbiology Spectrum*, 7(2), 7.2.23. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAI-0015-2019>
- Connor, M. G., Camarasa, T. M. N., Patey, E., Rasid, O., Barrio, L., Weight, C. M., Miller, D. P., Heyderman, R. S., Lamont, R. J., Enninga, J., & Hamon, M. A. (2021). The histone demethylase KDM6B fine-tunes the host response to Streptococcus pneumoniae. *Nature Microbiology*, 6(2), 257-269. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00805-8>



- Contractor, N. V., Bassiri, H., Reya, T., Park, A. Y., Baumgart, D. C., Wasik, M. A., Emerson, S. G., & Carding, S. R. (1998). Lymphoid hyperplasia, autoimmunity, and compromised intestinal intraepithelial lymphocyte development in colitis-free gnotobiotic IL-2-deficient mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *160*(1), 385-394.
- Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P., Ferguson, D. J. P., Campbell, B. J., Jewell, D., & Simmons, A. (2010). NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nature Medicine*, *16*(1), 90-97. <https://doi.org/10.1038/nm.2069>
- Cosnes, J. (2010). Smoking, Physical Activity, Nutrition and Lifestyle : Environmental Factors and Their Impact on IBD. *Digestive Diseases*, *28*(3), 411-417. <https://doi.org/10.1159/000320395>
- Cosnes, J., Beaugerie, L., Carbonnel, F., & Gendre, J. P. (2001). Smoking cessation and the course of Crohn's disease : An intervention study. *Gastroenterology*, *120*(5), 1093-1099. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.23231>
- Covington, H. E., Maze, I., LaPlant, Q. C., Vialou, V. F., Ohnishi, Y. N., Berton, O., Fass, D. M., Renthal, W., Rush, A. J., Wu, E. Y., Ghose, S., Krishnan, V., Russo, S. J., Tamminga, C., Haggarty, S. J., & Nestler, E. J. (2009). Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(37), 11451-11460. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1758-09.2009>
- Cox, S. R., Lindsay, J. O., Fromentin, S., Stagg, A. J., McCarthy, N. E., Galleron, N., Ibraim, S. B., Roume, H., Levenez, F., Pons, N., Maziers, N., Lomer, M. C., Ehrlich, S. D., Irving, P. M., & Whelan, K. (2020). Effects of Low FODMAP Diet on Symptoms, Fecal Microbiome, and Markers of Inflammation in Patients With Quiescent Inflammatory Bowel Disease in a Randomized Trial. *Gastroenterology*, *158*(1), 176-188.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.09.024>
- Craven, M., Egan, C. E., Dowd, S. E., McDonough, S. P., Dogan, B., Denkers, E. Y., Bowman, D., Scherl, E. J., & Simpson, K. W. (2012). Inflammation Drives Dysbiosis and Bacterial Invasion in Murine Models of Ileal Crohn's Disease. *PLoS ONE*, *7*(7), e41594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041594>
- Crohn, B. B., Ginzburg, L., & Oppenheimer, G. D. (1932). REGIONAL ILEITIS : A PATHOLOGIC AND CLINICAL ENTITY. *Journal of the American Medical Association*, *99*(16), 1323-1329. <https://doi.org/10.1001/jama.1932.02740680019005>
- Cropley, J. E., Suter, C. M., Beckman, K. B., & Martin, D. I. K. (2006). Germ-line epigenetic modification of the murine Avy allele by nutritional supplementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(46), 17308-17312. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607090103>
- Dalmaso, G., Nguyen, H. T. T., Faïs, T., Massier, S., Chevarin, C., Vazeille, E., Barnich, N., Delmas, J., & Bonnet, R. (2021). Yersiniabactin Siderophore of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli Is Involved in Autophagy Activation in Host Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(7), 3512. <https://doi.org/10.3390/ijms22073512>
- Dalmaso, G., Nguyen, H. T. T., Yan, Y., Laroui, H., Charania, M. A., Ayyadurai, S., Sitaraman, S. V., & Merlin, D. (2011). Microbiota Modulate Host Gene Expression via MicroRNAs. *PLoS ONE*, *6*(4), e19293. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019293>
- D'Aquila, P., Lynn Carelli, L., De Rango, F., Passarino, G., & Bellizzi, D. (2020). Gut Microbiota as Important Mediator Between Diet and DNA Methylation and Histone Modifications in the Host. *Nutrients*, *12*(3), 597. <https://doi.org/10.3390/nu12030597>
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., & Colombel, J.-F. (2004). High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, *127*(2), 412-421. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.04.061>
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., & Colombel, J. F. (1998). Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, *115*(6), 1405-1413. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70019-8](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70019-8)

- Dávalos-Salas, M., Montgomery, M. K., Reehorst, C. M., Nightingale, R., Ng, I., Anderton, H., Al-Obaidi, S., Lesmana, A., Scott, C. M., Ioannidis, P., Kalra, H., Keerthikumar, S., Tögel, L., Rigopoulos, A., Gong, S. J., Williams, D. S., Yoganantharaja, P., Bell-Anderson, K., Mathivanan, S., ... Mariadason, J. M. (2019). Deletion of intestinal Hdac3 remodels the lipidome of enterocytes and protects mice from diet-induced obesity. *Nature Communications*, *10*(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13180-8>
- Dave, M., Higgins, P. D., Middha, S., & Rioux, K. P. (2012). The human gut microbiome : Current knowledge, challenges, and future directions. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *160*(4), 246-257. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.05.003>
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, *505*(7484), 559-563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., & Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(33), 14691-14696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>
- De Zoeten, E. F., Wang, L., Sai, H., Dillmann, W. H., & Hancock, W. W. (2010). Inhibition of HDAC9 Increases T Regulatory Cell Function and Prevents Colitis in Mice. *Gastroenterology*, *138*(2), 583-594. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.10.037>
- de Bruyn, M., & Vermeire, S. (2017). NOD2 and bacterial recognition as therapeutic targets for Crohn's disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *21*(12), 1123-1139. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1397627>
- de Lange, K. M., Moutsianas, L., Lee, J. C., Lamb, C. A., Luo, Y., Kennedy, N. A., Jostins, L., Rice, D. L., Gutierrez-Achury, J., Ji, S.-G., Heap, G., Nimmo, E. R., Edwards, C., Henderson, P., Mowat, C., Sanderson, J., Satsangi, J., Simmons, A., Wilson, D. C., ... Barrett, J. C. (2017). Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. *Nature genetics*, *49*(2), 256-261. <https://doi.org/10.1038/ng.3760>
- Deleu, S., Machiels, K., Raes, J., Verbeke, K., & Vermeire, S. (2021). Short chain fatty acids and its producing organisms : An overlooked therapy for IBD? *EBioMedicine*, *66*. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103293>
- Delmas, J., Gibold, L., Faïs, T., Batista, S., Lereboure, M., Sinel, C., Vazeille, E., Cattoir, V., Buisson, A., Barnich, N., Dalmasso, G., & Bonnet, R. (2019). Metabolic adaptation of adherent-invasive Escherichia coli to exposure to bile salts. *Scientific Reports*, *9*, 2175. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38628-1>
- Demetter, P., De Vos, M., Van Huysse, J. A., Baeten, D., Ferdinande, L., Peeters, H., Mielants, H., Veys, E. M., De Keyser, F., & Cuvelier, C. A. (2005). Colon mucosa of patients both with spondyloarthritis and Crohn's disease is enriched with macrophages expressing the scavenger receptor CD163. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *64*(2), 321-324. <https://doi.org/10.1136/ard.2003.018382>
- Denizot, J., Desrichard, A., Agus, A., Uhrhammer, N., Dreux, N., Vouret-Craviari, V., Hofman, P., Darfeuille-Michaud, A., & Barnich, N. (2015). Diet-induced hypoxia responsive element demethylation increases CEACAM6 expression, favouring Crohn's disease-associated Escherichia coli colonisation. *Gut*, *64*(3), 428-437. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306944>
- Denizot, J., Sivignon, A., Barreau, F., Darcha, C., Chan, H. F. C., Stanners, C. P., Hofman, P., Darfeuille-Michaud, A., & Barnich, N. (2012). Adherent-invasive Escherichia coli induce claudin-2 expression and barrier defect in CEABAC10 mice and Crohn's disease patients. *Inflammatory Bowel Diseases*, *18*(2), 294-304. <https://doi.org/10.1002/ibd.21787>
- Desai, M. S., Seekatz, A. M., Koropatkin, N. M., Kamada, N., Hickey, C. A., Wolter, M., Pudlo, N. A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., Young, V. B., Henrissat, B., Wilmes, P., Stappenbeck, T. S., Núñez, G., & Martens, E. C. (2016). A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. *Cell*, *167*(5), 1339-1353.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.043>

- Deshpande, S. S., Nemani, H., Arumugam, G., Ravichandran, A., & Balasinar, N. H. (2020). High-fat diet-induced and genetically inherited obesity differentially alters DNA methylation profile in the germline of adult male rats. *Clinical Epigenetics*, *12*(1), 179. <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00974-7>
- de Sousa Figueiredo, M. B., Pradel, E., George, F., Mahieux, S., Houcke, I., Pottier, M., Fradin, C., Neut, C., Daniel, C., Bongiovanni, A., Foligné, B., & Titécat, M. (2021). Adherent-Invasive and Non-Invasive Escherichia coli Isolates Differ in Their Effects on Caenorhabditis elegans' Lifespan. *Microorganisms*, *9*(9), 1823. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091823>
- de Souza, H. S. P., & Fiocchi, C. (2016). Immunopathogenesis of IBD : Current state of the art. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *13*(1), 13-27. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.186>
- Deuring, J. J., Fuhler, G. M., Konstantinov, S. R., Peppelenbosch, M. P., Kuipers, E. J., de Haar, C., & van der Woude, C. J. (2014). Genomic ATG16L1 risk allele-restricted Paneth cell ER stress in quiescent Crohn's disease. *Gut*, *63*(7), 1081-1091. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303527>
- Devkota, S., Wang, Y., Musch, M., Leone, V., Fehlner-Peach, H., Nadimpalli, A., Antonopoulos, D. A., Jabri, B., & Chang, E. B. (2012). Dietary fat-induced taurocholic acid production promotes pathobiont and colitis in IL-10<sup>-/-</sup> mice. *Nature*, *487*(7405), 104-108. <https://doi.org/10.1038/nature11225>
- Dewanjee, S., Vallamkondu, J., Kalra, R. S., Chakraborty, P., Gangopadhyay, M., Sahu, R., Medala, V., John, A., Reddy, P. H., De Feo, V., & Kandimalla, R. (2021). The Emerging Role of HDACs : Pathology and Therapeutic Targets in Diabetes Mellitus. *Cells*, *10*(6), 1340. <https://doi.org/10.3390/cells10061340>
- de Zoeten, E. F., Wang, L., Butler, K., Beier, U. H., Akimova, T., Sai, H., Bradner, J. E., Mazitschek, R., Kozikowski, A. P., Matthias, P., & Hancock, W. W. (2011). Histone Deacetylase 6 and Heat Shock Protein 90 Control the Functions of Foxp3<sup>+</sup> T-Regulatory Cells. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(10), 2066-2078. <https://doi.org/10.1128/MCB.05155-11>
- D'Haens, G., Baert, F., van Assche, G., Caenepeel, P., Vergauwe, P., Tuynman, H., De Vos, M., van Deventer, S., Stitt, L., Donner, A., Vermeire, S., Van De Mierop, F. J., Coche, J.-C. R., van der Woude, J., Ochsenkühn, T., van Bodegraven, A. A., Van Hootegeem, P. P., Lambrecht, G. L., Mana, F., ... North-Holland Gut Club. (2008). Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease : An open randomised trial. *Lancet (London, England)*, *371*(9613), 660-667. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60304-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60304-9)
- D'Haens, G., Ferrante, M., Vermeire, S., Baert, F., Noman, M., Moortgat, L., Geens, P., Iwens, D., Aerden, I., Van Assche, G., Van Olmen, G., & Rutgeerts, P. (2012). Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *18*(12), 2218-2224. <https://doi.org/10.1002/ibd.22917>
- Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., & Zhou, M. M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, *399*(6735), 491-496. <https://doi.org/10.1038/20974>
- Di Paola, M., Rizzetto, L., Stefanini, I., Vitali, F., Massi-Benedetti, C., Tocci, N., Romani, L., Ramazzotti, M., Lionetti, P., De Filippo, C., & Cavalieri, D. (2020). Comparative immunophenotyping of Saccharomyces cerevisiae and Candida spp. Strains from Crohn's disease patients and their interactions with the gut microbiome. *Journal of Translational Autoimmunity*, *3*, 100036. <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2020.100036>
- Di Ruscio, M., Vernia, F., Ciccone, A., Frieri, G., & Latella, G. (2018). Surrogate Fecal Biomarkers in Inflammatory Bowel Disease : Rivals or Complementary Tools of Fecal Calprotectin? *Inflammatory Bowel Diseases*, *24*(1), 78-92. <https://doi.org/10.1093/ibd/izx011>
- DiNardo, A. R., Rajapakshe, K., Nishiguchi, T., Grimm, S. L., Mtetwa, G., Dlamini, Q., Kahari, J., Mahapatra, S., Kay, A., Maphalala, G., Mace, E. M., Makedonas, G., Cirillo, J. D., Netea, M. G., van Crevel, R., Coarfa, C., & Mandalakas, A. M. (2020). DNA hypermethylation during tuberculosis dampens host immune responsiveness. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(6), 3113-3123. <https://doi.org/10.1172/JCI134622>

- D'Incà, R., Di Leo, V., Corrao, G., Martines, D., D'Odorico, A., Mestriner, C., Venturi, C., Longo, G., & Sturniolo, G. C. (1999). Intestinal permeability test as a predictor of clinical course in Crohn's disease. *The American Journal of Gastroenterology*, *94*(10), 2956-2960. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1999.01444.x>
- Ding, R., Jin, Y., Liu, X., Ye, H., Zhu, Z., Zhang, Y., Wang, T., & Xu, Y. (2017). Dose- and time- effect responses of DNA methylation and histone H3K9 acetylation changes induced by traffic-related air pollution. *Scientific Reports*, *7*, 43737. <https://doi.org/10.1038/srep43737>
- Ding, S., Sun, S., Ding, R., Song, S., Cao, Y., & Zhang, L. (2022). Association between exposure to air pollutants and the risk of inflammatory bowel diseases visits. *Environmental Science and Pollution Research*, *29*(12), 17645-17654. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17009-0>
- Do, A., Reid, R. C., Lohman, R.-J., Sweet, M. J., Fairlie, D. P., & Iyer, A. (2017). An HDAC6 Inhibitor Confers Protection and Selectively Inhibits B-Cell Infiltration in DSS-Induced Colitis in Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *360*(1), 140-151. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.236711>
- Dolinoy, D. C., Weinhouse, C., Jones, T. R., Rozek, L. S., & Jirtle, R. L. (2010). Variable histone modifications at the Avy metastable epiallele. *Epigenetics*, *5*(7), 637-644. <https://doi.org/10.4161/epi.5.7.12892>
- Dong, W., & Hamon, M. A. (2020). Revealing eukaryotic histone-modifying mechanisms through bacterial infection. *Seminars in Immunopathology*, *42*(2), 201-213. <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00778-9>
- Dong, W., Rasid, O., Chevalier, C., Connor, M., Eldridge, M. J. G., & Hamon, M. A. (2020). Streptococcus pneumoniae Infection Promotes Histone H3 Dephosphorylation by Modulating Host PP1 Phosphatase. *Cell Reports*, *30*(12), 4016-4026.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.116>
- Dor, Y., & Cedar, H. (2018). Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *Lancet (London, England)*, *392*(10149), 777-786. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31268-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31268-6)
- Dortet, L., Lombardi, C., Cretin, F., Dessen, A., & Filloux, A. (2018). Pore-forming activity of the Pseudomonas aeruginosa type III secretion system translocon alters the host epigenome. *Nature Microbiology*, *3*(3), 3. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0109-7>
- Douadi, C., Vazeille, E., Chambon, C., Hébraud, M., Fargeas, M., Dodel, M., Coban, D., Pereira, B., Birer, A., Sauvanet, P., Buisson, A., & Barnich, N. (2022). Anti-TNF agents restrict adherent-invasive Escherichia coli replication within macrophages through modulation of chitinase 3-like 1 in patients with Crohn's disease. *Journal of Crohn's & Colitis*, *jjab236*. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjab236>
- Dougherty, U., Mustafi, R., Zhu, H., Zhu, X., Deb, D., Meredith, S. C., Ayaloglu-Butun, F., Fletcher, M., Sanchez, A., Pekow, J., Deng, Z., Amini, N., Konda, V. J., Rao, V. L., Sakuraba, A., Kwesi, A., Kupfer, S. S., Fichera, A., Joseph, L., ... Bissonnette, M. (2021). Upregulation of polycistronic microRNA-143 and microRNA-145 in colonocytes suppresses colitis and inflammation-associated colon cancer. *Epigenetics*, *16*(12), 1317-1334. <https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1863117>
- Downes, M., Ordentlich, P., Kao, H.-Y., Alvarez, J. G. A., & Evans, R. M. (2000). Identification of a nuclear domain with deacetylase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(19), 10330-10335.
- Dreux, N., Denizot, J., Martinez-Medina, M., Mellmann, A., Billig, M., Kisiela, D., Chattopadhyay, S., Sokurenko, E., Neut, C., Gower-Rousseau, C., Colombel, J.-F., Bonnet, R., Darfeuille-Michaud, A., & Barnich, N. (2013). Point Mutations in FimH Adhesin of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli Enhance Intestinal Inflammatory Response. *PLoS Pathogens*, *9*(1), e1003141. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003141>
- Dumych, T., Yamakawa, N., Sivignon, A., Garenaux, E., Robakiewicz, S., Coddeville, B., Bongiovanni, A., Bray, F., Barnich, N., Szunerits, S., Slomianny, C., Herrmann, M., Gouin, S. G., Lutsyk, A. D., Munoz, L. E., Lafont, F., Rolando, C., Bilyy, R., & Bouckaert, J. M. J. (2018). Oligomannose-Rich Membranes of Dying Intestinal Epithelial Cells Promote



- Host Colonization by Adherent-Invasive E. coli. *Frontiers in Microbiology*, 9, 742. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00742>
- Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., & Hrabeta, J. (2017). Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1414. <https://doi.org/10.3390/ijms18071414>
- Economou, M., Trikalinos, T. A., Loizou, K. T., Tsianos, E. V., & Ioannidis, J. P. A. (2004). Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: A metaanalysis. *The American Journal of Gastroenterology*, 99(12), 2393-2404. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2004.40304.x>
- Eldridge, M. J. G., & Hamon, M. A. (2021). Histone H3 deacetylation promotes host cell viability for efficient infection by *Listeria monocytogenes*. *PLOS Pathogens*, 17(12), e1010173. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010173>
- Elliott, T. R., Hudspith, B. N., Rayment, N. B., Prescott, N. J., Petrovska, L., Hermon-Taylor, J., Brostoff, J., Boussioutas, A., Mathew, C. G., & Sanderson, J. D. (2015). Defective macrophage handling of *Escherichia coli* in Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 30(8), 1265-1274. <https://doi.org/10.1111/jgh.12955>
- Eskandarian, H. A., Impens, F., Nahori, M.-A., Soubigou, G., Coppée, J.-Y., Cossart, P., & Hamon, M. A. (2013). A role for SIRT2-dependent histone H3K18 deacetylation in bacterial infection. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6145), 1238858. <https://doi.org/10.1126/science.1238858>
- Eun, C. S., Mishima, Y., Wohlgemuth, S., Liu, B., Bower, M., Carroll, I. M., & Sartor, R. B. (2014). Induction of Bacterial Antigen-Specific Colitis by a Simplified Human Microbiota Consortium in Gnotobiotic Interleukin-10<sup>-/-</sup> Mice. *Infection and Immunity*, 82(6), 2239-2246. <https://doi.org/10.1128/IAI.01513-13>
- Fan, J., Lou, B., Chen, W., Zhang, J., Lin, S., Lv, F., & Chen, Y. (2014). Down-regulation of HDAC5 inhibits growth of human hepatocellular carcinoma by induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(11), 11523-11532. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2358-2>
- Farias, N., Ho, N., Butler, S., Delaney, L., Morrison, J., Shahrzad, S., & Coomber, B. L. (2015). The effects of folic acid on global DNA methylation and colonosphere formation in colon cancer cell lines. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(8), 818-826. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.02.002>
- Fasseu, M., Tréton, X., Guichard, C., Pedruzzi, E., Cazals-Hatem, D., Richard, C., Aparicio, T., Daniel, F., Soulé, J.-C., Moreau, R., Bouhnik, Y., Laburthe, M., Groyer, A., & Ogier-Denis, E. (2010). Identification of Restricted Subsets of Mature microRNA Abnormally Expressed in Inactive Colonic Mucosa of Patients with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE*, 5(10), e13160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013160>
- Fawad, J. A., Luzader, D. H., Hanson, G. F., Moutinho, T. J., McKinney, C. A., Mitchell, P. G., Brown-Steinke, K., Kumar, A., Park, M., Lee, S., Bolick, D. T., Medlock, G. L., Zhao, J. Y., Rosselot, A. E., Chou, C. J., Eshleman, E., Alenghat, T., Hong, C. I., Papin, J. A., & Moore, S. R. (2022). Histone deacetylase inhibition by gut microbe-generated short chain fatty acids entrains intestinal epithelial circadian rhythms. *Gastroenterology*, S0016-5085(22)00827-7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.07.051>
- Felice, C., Lewis, A., Iqbal, S., Gordon, H., Rigoni, A., Colombo, M. P., Armuzzi, A., Feakins, R., Lindsay, J. O., & Silver, A. (2020). Intestinal Inflammation is Linked to Hypoacetylation of Histone 3 Lysine 27 and can be Reversed by Valproic Acid Treatment in Inflammatory Bowel Disease Patients. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 11(3), 889-891.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.11.009>
- Feller, M., Huwiler, K., Schoepfer, A., Shang, A., Furrer, H., & Egger, M. (2010). Long-term antibiotic treatment for Crohn's disease: Systematic review and meta-analysis of placebo-controlled trials. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50(4), 473-480. <https://doi.org/10.1086/649923>

- Feller, M., Huwiler, K., Stephan, R., Altpeter, E., Shang, A., Furrer, H., Pfyffer, G. E., Jemmi, T., Baumgartner, A., & Egger, M. (2007). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(9), 607-613. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70211-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70211-6)
- Fellows, R., Denizot, J., Stellato, C., Cuomo, A., Jain, P., Stoyanova, E., Balázs, S., Hajnád, Z., Liebert, A., Kazakevych, J., Blackburn, H., Corrêa, R. O., Fachi, J. L., Sato, F. T., Ribeiro, W. R., Ferreira, C. M., Perée, H., Spagnuolo, M., Mattiuz, R., ... Varga-Weisz, P. (2018). Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases. *Nature Communications*, 9, 105. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02651-5>
- Fenley, A. T., Adams, D. A., & Onufriev, A. V. (2010). Charge State of the Globular Histone Core Controls Stability of the Nucleosome. *Biophysical Journal*, 99(5), 1577-1585. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.06.046>
- Fernandes, M. A., Verstraete, S. G., Phan, T. G., Deng, X., Stekol, E., LaMere, B., Lynch, S. V., Heyman, M. B., & Delwart, E. (2019). Enteric Virome and Bacterial Microbiota in Children with Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 68(1), 30-36. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002140>
- Fernández-Ponce, C., Navarro Quiroz, R., Díaz Perez, A., Aroca Martínez, G., Cadena Bonfanti, A., Acosta Hoyos, A., Gómez Escorcia, L., Hernández Agudelo, S., Orozco Sánchez, C., Villarreal Camacho, J., Atencio Ibarra, L., Consuegra Machado, J., Espinoza Garavito, A., García-Cózar, F., & Navarro Quiroz, E. (2021). MicroRNAs overexpressed in Crohn's disease and their interactions with mechanisms of epigenetic regulation explain novel aspects of Crohn's disease pathogenesis. *Clinical Epigenetics*, 13(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01022-8>
- Ferrand, A., Al Nabhani, Z., Tapias, N. S., Mas, E., Hugot, J.-P., & Barreau, F. (2018). NOD2 Expression in Intestinal Epithelial Cells Protects Toward the Development of Inflammation and Associated Carcinogenesis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 7(2), 357-369. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.10.009>
- Fiorino, G., Estevinho, M. M., Lopes, D. J. M., Chersi, F., Allocca, M., Souto, M. T., Danese, S., & Magro, F. (2021). Inflammatory Bowel Disease in Migrant Populations: Should we Look Even Further Back? *Current Drug Targets*, 22(15), 1706-1715. <https://doi.org/10.2174/1389450122666210203193817>
- Fischer, C., Leithner, K., Wohlkoenig, C., Quehenberger, F., Bertsch, A., Olschewski, A., Olschewski, H., & Hrzenjak, A. (2015). Panobinostat reduces hypoxia-induced cisplatin resistance of non-small cell lung carcinoma cells via HIF-1 $\alpha$  destabilization. *Molecular Cancer*, 14, 4. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-14-4>
- Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M. J., Guenther, M. G., Lazar, M. A., Voelter, W., & Verdin, E. (2002). Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Molecular Cell*, 9(1), 45-57. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00429-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00429-4)
- Fischle, W., Wang, Y., & Allis, C. D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2), 172-183. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(03\)00013-9](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(03)00013-9)
- Frank, D. N., Robertson, C. E., Hamm, C. M., Kpadeh, Z., Zhang, T., Chen, H., Zhu, W., Sartor, R. B., Boedeker, E. C., Harpaz, N., Pace, N. R., & Li, E. (2011). Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*, 17(1), 10.1002/ibd.21339. <https://doi.org/10.1002/ibd.21339>
- Frank, D. N., St Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., & Pace, N. R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(34), 13780-13785. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706625104>
- Franzè, E., Caruso, R., Stolfi, C., Sarra, M., Cupi, M. L., Caprioli, F., Monteleone, I., Zorzi, F., De Nitto, D., Colantoni, A., Biancone, L., Pallone, F., & Monteleone, G. (2013). Lesional accumulation of CD163-expressing cells in the gut of patients with inflammatory bowel disease. *PloS One*, 8(7), e69839. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069839>



- Fraschilla, I., Amatullah, H., Rahman, R.-U., & Jeffrey, K. L. (2022). Immune chromatin reader SP140 regulates microbiota and risk for inflammatory bowel disease. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.03.29.486273>
- Friedrich, M., Gerbeth, L., Gerling, M., Rosenthal, R., Steiger, K., Weidinger, C., Keye, J., Wu, H., Schmidt, F., Weichert, W., Siegmund, B., & Glauen, R. (2019). HDAC inhibitors promote intestinal epithelial regeneration via autocrine TGFβ1 signalling in inflammation. *Mucosal Immunology*, *12*(3), 656-667. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0135-7>
- Fries, W., Renda, M. C., Lo Presti, M. A., Raso, A., Orlando, A., Oliva, L., Giofré, M. R., Maggio, A., Mattaliano, A., Macaluso, A., & Cottone, M. (2005). Intestinal permeability and genetic determinants in patients, first-degree relatives, and controls in a high-incidence area of Crohn's disease in Southern Italy. *The American Journal of Gastroenterology*, *100*(12), 2730-2736. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.00325.x>
- Froicu, M., & Cantorna, M. T. (2007). Vitamin D and the vitamin D receptor are critical for control of the innate immune response to colonic injury. *BMC Immunology*, *8*, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-5>
- Fry, R. C., Rager, J. E., Bauer, R., Sebastian, E., Peden, D. B., Jaspers, I., & Alexis, N. E. (2014). Air toxics and epigenetic effects : Ozone altered microRNAs in the sputum of human subjects. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *306*(12), L1129-L1137. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00348.2013>
- Fu, X., Dong, B., Tian, Y., Lefebvre, P., Meng, Z., Wang, X., Pattou, F., Han, W., Wang, X., Lou, F., Jove, R., Staels, B., Moore, D. D., & Huang, W. (2015). MicroRNA-26a regulates insulin sensitivity and metabolism of glucose and lipids. *The Journal of Clinical Investigation*, *125*(6), 2497-2509. <https://doi.org/10.1172/JCI75438>
- Fujimoto, T., Imaeda, H., Takahashi, K., Kasumi, E., Bamba, S., Fujiyama, Y., & Andoh, A. (2013). Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *28*(4), 613-619. <https://doi.org/10.1111/jgh.12073>
- Fujimura, Y., Kamoi, R., & Iida, M. (1996). Pathogenesis of aphthoid ulcers in Crohn's disease : Correlative findings by magnifying colonoscopy, electron microscopy, and immunohistochemistry. *Gut*, *38*(5), 724-732.
- Furumai, R., Matsuyama, A., Kobashi, N., Lee, K.-H., Nishiyama, M., Nakajima, H., Tanaka, A., Komatsu, Y., Nishino, N., Yoshida, M., & Horinouchi, S. (2002). FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Research*, *62*(17), 4916-4921.
- Gajendran, M., Loganathan, P., Catinella, A. P., & Hashash, J. G. (2018). A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Disease-a-Month*, *64*(2), 20-57. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2017.07.001>
- Galasinski, S. C., Resing, K. A., Goodrich, J. A., & Ahn, N. G. (2002). Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(22), 19618-19626. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201174200>
- Galtier, M., De Sordi, L., Sivignon, A., de Vallée, A., Maura, D., Neut, C., Rahmouni, O., Wannerberger, K., Darfeuille-Michaud, A., Desreumaux, P., Barnich, N., & Debarbieux, L. (2017). Bacteriophages Targeting Adherent Invasive *Escherichia coli* Strains as a Promising New Treatment for Crohn's Disease. *Journal of Crohn's & Colitis*, *11*(7), 840-847. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw224>
- Gammoh, N. Z., & Rink, L. (2017). Zinc in Infection and Inflammation. *Nutrients*, *9*(6), 624. <https://doi.org/10.3390/nu9060624>
- Garcia-Garcia, J. C., Barat, N. C., Trembley, S. J., & Dumler, J. S. (2009). Epigenetic silencing of host cell defense genes enhances intracellular survival of the rickettsial pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. *PLoS Pathogens*, *5*(6), e1000488. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000488>
- Garcia-Garcia, J. C., Rennoll-Bankert, K. E., Pelly, S., Milstone, A. M., & Dumler, J. S. (2009). Silencing of Host Cell CYBB Gene Expression by the Nuclear Effector AnkA of the Intracellular Pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. *Infection and Immunity*, *77*(6), 2385-2391. <https://doi.org/10.1128/IAI.00023-09>

- Gates, L. A., Shi, J., Rohira, A. D., Feng, Q., Zhu, B., Bedford, M. T., Sagum, C. A., Jung, S. Y., Qin, J., Tsai, M.-J., Tsai, S. Y., Li, W., Foulds, C. E., & O'Malley, B. W. (2017). Acetylation on histone H3 lysine 9 mediates a switch from transcription initiation to elongation. *Journal of Biological Chemistry*, 292(35), 14456-14472. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.802074>
- Gatla, H. R., Muniraj, N., Thevkar, P., Yavvari, S., Sukhavasi, S., & Makena, M. R. (2019). Regulation of Chemokines and Cytokines by Histone Deacetylases and an Update on Histone Decetylase Inhibitors in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1110. <https://doi.org/10.3390/ijms20051110>
- Gatt, K., Schembri, J., Katsanos, K. H., Christodoulou, D., Karmiris, K., Kopylov, U., Pontas, C., Koutroubakis, I. E., Foteinogiannopoulou, K., Fabian, A., Molnar, T., Zammit, D., Fragaki, M., Balomenos, D., Zingboim, N., Ben Horin, S., Mantzaris, G. J., & Ellul, P. (2019). Inflammatory Bowel Disease [IBD] and Physical Activity : A Study on the Impact of Diagnosis on the Level of Exercise Amongst Patients With IBD. *Journal of Crohn's & Colitis*, 13(6), 686-692. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy214>
- Ge, Z., Da, Y., Xue, Z., Zhang, K., Zhuang, H., Peng, M., Li, Y., Li, W., Simard, A., Hao, J., Yao, Z., & Zhang, R. (2013). Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, suppresses dendritic cell function and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Experimental Neurology*, 241, 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.12.006>
- Geng, H., Harvey, C. T., Pittsenbarger, J., Liu, Q., Beer, T. M., Xue, C., & Qian, D. Z. (2011). HDAC4 Protein Regulates HIF1 $\alpha$  Protein Lysine Acetylation and Cancer Cell Response to Hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(44), 38095-38102. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.257055>
- Geremia, A., & Arancibia-Cárcamo, C. V. (2017). Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 8, 1296. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01296>
- Geremia, A., Arancibia-Cárcamo, C. V., Fleming, M. P. P., Rust, N., Singh, B., Mortensen, N. J., Travis, S. P. L., & Powrie, F. (2011). IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(6), 1127-1133. <https://doi.org/10.1084/jem.20101712>
- Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L. A., Vázquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B., Schwager, E., Knights, D., Song, S. J., Yassour, M., Morgan, X. C., Kostic, A. D., Luo, C., González, A., McDonald, D., Haberman, Y., Walters, T., Baker, S., Rosh, J., ... Xavier, R. J. (2014). The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell host & microbe*, 15(3), 382-392. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.005>
- Ghiboub, M., Koster, J., Craggs, P. D., Li Yim, A. Y. F., Shillings, A., Hutchinson, S., Bingham, R. P., Gatfield, K., Hageman, I. L., Yao, G., O'Keefe, H. P., Coffin, A., Patel, A., Sloan, L. A., Mitchell, D. J., Hayhow, T. G., Lunven, L., Watson, R. J., Blunt, C. E., ... de Jonge, W. J. (2022). Modulation of macrophage inflammatory function through selective inhibition of the epigenetic reader protein SP140. *BMC Biology*, 20(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01380-6>
- Ghizzoni, M., Haisma, H. J., Maarsingh, H., & Dekker, F. J. (2011). Histone acetyltransferases are crucial regulators in NF- $\kappa$ B mediated inflammation. *Drug Discovery Today*, 16(11-12), 504-511. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.03.009>
- Gibold, L., Garenaux, E., Dalmasso, G., Gallucci, C., Cia, D., Mottet-Auselo, B., Faïs, T., Darfeuille-Michaud, A., Nguyen, H. T. T., Barnich, N., Bonnet, R., & Delmas, J. (2016). The Vat-AIEC protease promotes crossing of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated Escherichia coli. *Cellular Microbiology*, 18(5), 617-631. <https://doi.org/10.1111/cmi.12539>
- Gill, P. A., Inniss, S., Kumagai, T., Rahman, F. Z., & Smith, A. M. (2022). The Role of Diet and Gut Microbiota in Regulating Gastrointestinal and Inflammatory Disease. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2022.866059>
- Gillespie, J., Savic, S., Wong, C., Hempshall, A., Inman, M., Emery, P., Grigg, R., & McDermott, M. F. (2012). Histone deacetylases are dysregulated in rheumatoid arthritis and a novel histone deacetylase 3-selective inhibitor reduces interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis and Rheumatism*, 64(2), 418-422. <https://doi.org/10.1002/art.33382>

- Gimier, E., Chervy, M., Agus, A., Sivignon, A., Billard, E., Privat, M., Viala, S., Minet-Quinard, R., Buisson, A., Vazeille, E., Barnich, N., & Denizot, J. (2020). Methyl-donor supplementation prevents intestinal colonization by Adherent-Invasive *E. coli* in a mouse model of Crohn's disease. *Scientific Reports*, *10*, 12922. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69472-3>
- Giralt, A., Puigdemívol, M., Carretón, O., Paoletti, P., Valero, J., Parra-Damas, A., Saura, C. A., Alberch, J., & Ginés, S. (2012). Long-term memory deficits in Huntington's disease are associated with reduced CBP histone acetylase activity. *Human Molecular Genetics*, *21*(6), 1203-1216. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr552>
- Giridharan, S., & Srinivasan, M. (2018). Mechanisms of NF- $\kappa$ B p65 and strategies for therapeutic manipulation. *Journal of Inflammation Research*, *11*, 407-419. <https://doi.org/10.2147/JIR.S140188>
- Glasser, A.-L., Boudeau, J., Barnich, N., Perruchot, M.-H., Colombel, J.-F., & Darfeuille-Michaud, A. (2001). Adherent Invasive *Escherichia coli* Strains from Patients with Crohn's Disease Survive and Replicate within Macrophages without Inducing Host Cell Death. *Infection and Immunity*, *69*(9), 5529-5537. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5529-5537.2001>
- Glauben, R., Batra, A., Fedke, I., Zeitz, M., Lehr, H. A., Leoni, F., Mascagni, P., Fantuzzi, G., Dinarello, C. A., & Siegmund, B. (2006). Histone Hyperacetylation Is Associated with Amelioration of Experimental Colitis in Mice. *The Journal of Immunology*, *176*(8), 5015-5022. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.8.5015>
- Glauben, R., Batra, A., Stroh, T., Erben, U., Fedke, I., Lehr, H. A., Leoni, F., Mascagni, P., Dinarello, C. A., Zeitz, M., & Siegmund, B. (2008). Histone deacetylases: Novel targets for prevention of colitis-associated cancer in mice. *Gut*, *57*(5), 613-622. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.134650>
- Gomollón, F., Dignass, A., Annese, V., Tilg, H., Van Assche, G., Lindsay, J. O., Peyrin-Biroulet, L., Cullen, G. J., Daperno, M., Kucharzik, T., Rieder, F., Almer, S., Armuzzi, A., Harbord, M., Langhorst, J., Sans, M., Chowers, Y., Fiorino, G., Juillerat, P., ... ECCO. (2017). 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *Journal of Crohn's & Colitis*, *11*(1), 3-25. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw168>
- Gonneaud, A., Gagné, J. M., Turgeon, N., & Asselin, C. (2014). The histone deacetylase Hdac1 regulates inflammatory signalling in intestinal epithelial cells. *Journal of Inflammation (London, England)*, *11*(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s12950-014-0043-2>
- Gonneaud, A., Turgeon, N., Boisvert, F.-M., Boudreau, F., & Asselin, C. (2021). JAK-STAT Pathway Inhibition Partially Restores Intestinal Homeostasis in Hdac1- and Hdac2-Intestinal Epithelial Cell-Deficient Mice. *Cells*, *10*(2), 224. <https://doi.org/10.3390/cells10020224>
- Gonneaud, A., Turgeon, N., Boudreau, F., Perreault, N., Rivard, N., & Asselin, C. (2016). Distinct Roles for Intestinal Epithelial Cell-Specific Hdac1 and Hdac2 in the Regulation of Murine Intestinal Homeostasis. *Journal of Cellular Physiology*, *231*(2), 436-448. <https://doi.org/10.1002/jcp.25090>
- Gonneaud, A., Turgeon, N., Jones, C., Couture, C., Lévesque, D., Boisvert, F.-M., Boudreau, F., & Asselin, C. (2019). HDAC1 and HDAC2 independently regulate common and specific intrinsic responses in murine enteroids. *Scientific Reports*, *9*(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41842-6>
- Grabiec, A. M., Korchynski, O., Tak, P. P., & Reedquist, K. A. (2011). Histone deacetylase inhibitors suppress rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte and macrophage IL-6 production by accelerating mRNA decay. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *71*(3), 424-431. <https://doi.org/10.1136/ard.2011.154211>
- Grabiec, A. M., Krausz, S., de Jager, W., Burakowski, T., Groot, D., Sanders, M. E., Prakken, B. J., Maslinski, W., Eldering, E., Tak, P. P., & Reedquist, K. A. (2010). Histone deacetylase inhibitors suppress inflammatory activation of rheumatoid arthritis patient synovial macrophages and tissue. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *184*(5), 2718-2728. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901467>

- Grabiec, A. M., & Potempa, J. (2018). Epigenetic regulation in bacterial infections : Targeting histone deacetylases. *Critical reviews in microbiology*, 44(3), 336-350. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1373063>
- Graham, D. B., & Xavier, R. J. (2020). Pathway Paradigms Revealed from the Genetics of Inflammatory Bowel Disease. *Nature*, 578(7796), 527-539. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2025-2>
- Gross, T. J., Powers, L. S., Boudreau, R. L., Brink, B., Reisetter, A., Goel, K., Gerke, A. K., Hassan, I. H., & Monick, M. M. (2014). A MicroRNA Processing Defect in Smokers' Macrophages Is Linked to SUMOylation of the Endonuclease DICER. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(18), 12823-12834. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.565473>
- Grossman, S. R. (2001). P300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *European Journal of Biochemistry*, 268(10), 2773-2778. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02226.x>
- Grozinger, C. M., & Schreiber, S. L. (2000). Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), 7835-7840.
- Gruber, L., Kisling, S., Lichti, P., Martin, F.-P., May, S., Klingenspor, M., Lichtenegger, M., Rychlik, M., & Haller, D. (2013). High fat diet accelerates pathogenesis of murine Crohn's disease-like ileitis independently of obesity. *PloS One*, 8(8), e71661. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071661>
- Grützku, A., Hanski, C., Hahn, H., & Riecken, E. O. (1990). Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches : A common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut*, 31(9), 1011-1015. <https://doi.org/10.1136/gut.31.9.1011>
- Günzel, D., & Yu, A. S. L. (2013). Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiological Reviews*, 93(2), 525-569. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2012>
- Guo, W., Zhang, Z., Li, L., Liang, X., Wu, Y., Wang, X., Ma, H., Cheng, J., Zhang, A., Tang, P., Wang, C.-Z., Wan, J.-Y., Yao, H., & Yuan, C.-S. (2022). Gut microbiota induces DNA methylation via SCFAs predisposing obesity-prone individuals to diabetes. *Pharmacological Research*, 182, 106355. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106355>
- Guo, X., Li, J., Tang, R., Zhang, G., Zeng, H., Wood, R. J., & Liu, Z. (2017). High Fat Diet Alters Gut Microbiota and the Expression of Paneth Cell-Antimicrobial Peptides Preceding Changes of Circulating Inflammatory Cytokines. *Mediators of Inflammation*, 2017, 9474896. <https://doi.org/10.1155/2017/9474896>
- Guo, Z., Cai, X., Guo, X., Xu, Y., Gong, J., Li, Y., & Zhu, W. (2018). Let-7b ameliorates Crohn's disease-associated adherent-invasive *E coli* induced intestinal inflammation via modulating Toll-Like Receptor 4 expression in intestinal epithelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 156, 196-203. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.029>
- Gury-BenAri, M., Thaïss, C. A., Serafini, N., Winter, D. R., Giladi, A., Lara-Astiaso, D., Levy, M., Salame, T. M., Weiner, A., David, E., Shapiro, H., Dori-Bachash, M., Pevsner-Fischer, M., Lorenzo-Vivas, E., Keren-Shaul, H., Paul, F., Harmelin, A., Eberl, G., Itzkovitz, S., ... Amit, I. (2016). The Spectrum and Regulatory Landscape of Intestinal Innate Lymphoid Cells Are Shaped by the Microbiome. *Cell*, 166(5), 1231-1246.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.043>
- Habash, N. W., Sehrawat, T. S., Shah, V. H., & Cao, S. (2022). Epigenetics of alcohol-related liver diseases. *JHEP Reports*, 4(5), 100466. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2022.100466>
- Hagelkruys, A., Lagger, S., Krahmer, J., Leopoldi, A., Artaker, M., Pusch, O., Zezula, J., Weissmann, S., Xie, Y., Schöfer, C., Schleederer, M., Brosch, G., Matthias, P., Selfridge, J., Lassmann, H., Knoblich, J. A., & Seiser, C. (2014). A single allele of *Hdac2* but not *Hdac1* is sufficient for normal mouse brain development in the absence of its paralog. *Development (Cambridge, England)*, 141(3), 604-616. <https://doi.org/10.1242/dev.100487>
- Haggarty, S. J., Koeller, K. M., Wong, J. C., Grozinger, C. M., & Schreiber, S. L. (2003). Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), 4389-4394. <https://doi.org/10.1073/pnas.0430973100>



- Hai, R., He, L., Shu, G., & Yin, G. (2021). Characterization of Histone Deacetylase Mechanisms in Cancer Development. *Frontiers in Oncology*, *11*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.700947>
- Halfvarson, J., Bodin, L., Tysk, C., Lindberg, E., & Järnerot, G. (2003). Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: A long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology*, *124*(7), 1767-1773. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(03\)00385-8](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(03)00385-8)
- Halfvarson, J., Standaert-Vitse, A., Järnerot, G., Sendid, B., Jouault, T., Bodin, L., Duhamel, A., Colombel, J. F., Tysk, C., & Poulain, D. (2005). Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in twins with inflammatory bowel disease. *Gut*, *54*(9), 1237-1243. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.066860>
- Halme, L., Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Lappalainen, M., Färkkilä, M., & Kontula, K. (2006). Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *12*(23), 3668-3672. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i23.3668>
- Ham, M., Longhi, M. S., Lahiff, C., Cheifetz, A., Robson, S., & Moss, A. C. (2014). Vitamin D Levels in Adults with Crohn's Disease Are Responsive to Disease Activity and Treatment. *Inflammatory bowel diseases*, *20*(5), 856-860. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000016>
- Hamon, M. A., Batsché, E., Régnault, B., Tham, T. N., Seveau, S., Muchardt, C., & Cossart, P. (2007). Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(33), 13467-13472. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702729104>
- Hamon, M. A., & Cossart, P. (2011). K<sup>+</sup> efflux is required for histone H3 dephosphorylation by *Listeria monocytogenes* listeriolysin O and other pore-forming toxins. *Infection and Immunity*, *79*(7), 2839-2846. <https://doi.org/10.1128/IAI.01243-10>
- Hamon, M. A., Ribet, D., Stavru, F., & Cossart, P. (2012). Listeriolysin O: The Swiss army knife of *Listeria*. *Trends in Microbiology*, *20*(8), 360-368. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.006>
- Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F. M., Briggs, J., Günther, S., Prescott, N. J., Onnie, C. M., Häslér, R., Sipos, B., Fölsch, U. R., Lengauer, T., Platzer, M., Mathew, C. G., ... Schreiber, S. (2007). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature Genetics*, *39*(2), 207-211. <https://doi.org/10.1038/ng1954>
- Hang, S., Paik, D., Yao, L., Kim, E., Jamma, T., Lu, J., Ha, S., Nelson, B. N., Kelly, S. P., Wu, L., Zheng, Y., Longman, R. S., Rastinejad, F., Devlin, A. S., Krout, M. R., Fischbach, M. A., Littman, D. R., & Huh, J. R. (2019). Bile acid metabolites control Th17 and Treg cell differentiation. *Nature*, *576*(7785), 143-148. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1785-z>
- Hanna, J., Hossain, G. S., & Kocerha, J. (2019). The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Frontiers in Genetics*, *10*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.00478>
- Harouz, H., Rachez, C., Meijer, B. M., Marteyn, B., Donnadieu, F., Cammas, F., Muchardt, C., Sansonetti, P., & Arbibe, L. (2014). *Shigella flexneri* targets the HP1 $\gamma$  subcode through the phosphothreonine lyase OspF. *The EMBO Journal*, *33*(22), 2606-2622. <https://doi.org/10.15252/embj.201489244>
- Harris, R. Alan., Nagy-Szakal, D., Pedersen, N., Opekun, A., Bronsky, J., Munkholm, P., Jespersgaard, C., Andersen, P. S., Melegh, B., Ferry, G., Jess, T., & Kellermayer, R. (2012). Genome Wide Peripheral Blood Leukocyte DNA Methylation Microarrays Identified a Single Association with Inflammatory Bowel Diseases. *Inflammatory bowel diseases*, *18*(12), 10.1002/ibd.22956. <https://doi.org/10.1002/ibd.22956>
- Hart, A. L., Al-Hassi, H. O., Rigby, R. J., Bell, S. J., Emmanuel, A. V., Knight, S. C., Kamm, M. A., & Stagg, A. J. (2005). Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, *129*(1), 50-65. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.05.013>



- Hecklau, K., Mueller, S., Koch, S. P., Mehkary, M. H., Kilic, B., Harms, C., Boehm-Sturm, P., & Yildirim, F. (2021). The Effects of Selective Inhibition of Histone Deacetylase 1 and 3 in Huntington's Disease Mice. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2021.616886>
- Henderson, P., & Stevens, C. (2012). The Role of Autophagy in Crohn's Disease. *Cells*, 1(3), 492-519. <https://doi.org/10.3390/cells1030492>
- Herath, M., Hosie, S., Bornstein, J. C., Franks, A. E., & Hill-Yardin, E. L. (2020). The Role of the Gastrointestinal Mucus System in Intestinal Homeostasis: Implications for Neurological Disorders. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00248>
- Hew, K. M., Walker, A. I., Kohli, A., Garcia, M., Syed, A., McDonald-Hyman, C., Noth, E. M., Mann, J. K., Pratt, B., Balmes, J., Hammond, S. K., Eisen, E. A., & Nadeau, K. C. (2015). Childhood exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons is linked to epigenetic modifications and impaired systemic immunity in T cells. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 45(1), 238-248. <https://doi.org/10.1111/cea.12377>
- Higuchi, L. M., Khalili, H., Chan, A. T., Richter, J. M., Bousvaros, A., & Fuchs, C. S. (2012). A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. *The American Journal of Gastroenterology*, 107(9), 1399-1406. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.196>
- Hildebrandt, M. A., Hoffmann, C., Sherrill-Mix, S. A., Keilbaugh, S. A., Hamady, M., Chen, Y.-Y., Knight, R., Ahima, R. S., Bushman, F., & Wu, G. D. (2009). High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*, 137(5), 1716-1724.e1-2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.08.042>
- Hilsden, R. J., Meddings, J. B., Hardin, J., Gall, G. D., & Sutherland, L. R. (1999). Intestinal Permeability and Postheparin Plasma Diamine Oxidase Activity in the Prediction of Crohn's Disease Relapse. *Inflammatory Bowel Diseases*, 5(2), 85-91. <https://doi.org/10.1097/00054725-199905000-00003>
- Hlady, R. A., Tiedemann, R. L., Puszyk, W., Zendejas, I., Roberts, L. R., Choi, J.-H., Liu, C., & Robertson, K. D. (2014). Epigenetic signatures of alcohol abuse and hepatitis infection during human hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*, 5(19), 9425-9443.
- Hlavaty, T., Toth, J., Koller, T., Krajcovicova, A., Oravcova, S., Zelinkova, Z., & Huorka, M. (2013). Smoking, breastfeeding, physical inactivity, contact with animals, and size of the family influence the risk of inflammatory bowel disease: A Slovak case-control study. *United European Gastroenterology Journal*, 1(2), 109-119. <https://doi.org/10.1177/2050640613478011>
- Ho, T. C. S., Chan, A. H. Y., & Ganesan, A. (2020). Thirty Years of HDAC Inhibitors: 2020 Insight and Hindsight. *Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00830>
- Hoarau, G., Mukherjee, P. K., Gower-Rousseau, C., Hager, C., Chandra, J., Retuerto, M. A., Neut, C., Vermeire, S., Clemente, J., Colombel, J. F., Fujioka, H., Poulain, D., Sendid, B., & Ghannoum, M. A. (2016). Bacteriome and Mycobiome Interactions Underscore Microbial Dysbiosis in Familial Crohn's Disease. *MBio*, 7(5), e01250-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01250-16>
- Hollander, D., Vadheim, C. M., Brettholz, E., Petersen, G. M., Delahunty, T., & Rotter, J. I. (1986). Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Annals of Internal Medicine*, 105(6), 883-885. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-105-6-883>
- Homer, C. R., Richmond, A. L., Rebert, N. A., Achkar, J.-P., & McDonald, C. (2010). ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology*, 139(5), 1630-1641, 1641.e1-2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.07.006>

- Honap, S., Johnston, E., Agrawal, G., Al-Hakim, B., Hermon-Taylor, J., & Sanderson, J. (2020). Anti-Mycobacterium paratuberculosis (MAP) therapy for Crohn's disease: An overview and update. *Frontline Gastroenterology*, *12*(5), 397-403. <https://doi.org/10.1136/flgastro-2020-101471>
- Hong, S. N., Park, C., Park, S. J., Lee, C. K., Ye, B. D., Kim, Y. S., Lee, S., Chae, J., Kim, J.-I., Kim, Y.-H., & Diseases (KASID), I. S. G. of the K. A. for the S. of I. (2016). Deep resequencing of 131 Crohn's disease associated genes in pooled DNA confirmed three reported variants and identified eight novel variants. *Gut*, *65*(5), 788-796. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308617>
- Hornsuh, M., Wirthgen, E., Wolfien, M., Singh, K. P., Wolkenhauer, O., & Däbritz, J. (2021). The role of epigenetic modifications for the pathogenesis of Crohn's disease. *Clinical Epigenetics*, *13*, 108. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01089-3>
- Horvath, S., & Raj, K. (2018). DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nature Reviews. Genetics*, *19*(6), 371-384. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0004-3>
- Host, L., Anglard, P., Romieu, P., Thibault, C., Dembele, D., Aunis, D., & Zwiller, J. (2010). Inhibition of histone deacetylases in rats self-administering cocaine regulates lissencephaly gene-1 and reelin gene expression, as revealed by microarray technique. *Journal of Neurochemistry*, *113*(1), 236-247. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06591.x>
- Hotchkiss, R. D. (1948). The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*, *175*(1), 315-332.
- Howe, C. G., Zhou, M., Wang, X., Pittman, G. S., Thompson, I. J., Campbell, M. R., Bastain, T. M., Grubbs, B. H., Salam, M. T., Hoyo, C., Bell, D. A., Smith, A. D., & Breton, C. V. (2019). Associations between Maternal Tobacco Smoke Exposure and the Cord Blood [Formula : See text] DNA Methylation. *Environmental Health Perspectives*, *127*(4), 47009. <https://doi.org/10.1289/EHP3398>
- Howell, K. J., Kraiczy, J., Nayak, K. M., Gasparetto, M., Ross, A., Lee, C., Mak, T. N., Koo, B.-K., Kumar, N., Lawley, T., Sinha, A., Rosenstiel, P., Heuschkel, R., Stegle, O., & Zilbauer, M. (2018). DNA Methylation and Transcription Patterns in Intestinal Epithelial Cells From Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Diseases Differentiate Disease Subtypes and Associate With Outcome. *Gastroenterology*, *154*(3), 585-598. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.10.007>
- Hu, E., Chen, Z., Fredrickson, T., Zhu, Y., Kirkpatrick, R., Zhang, G. F., Johanson, K., Sung, C. M., Liu, R., & Winkler, J. (2000). Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(20), 15254-15264. <https://doi.org/10.1074/jbc.M908988199>
- Huang, B., Yang, X.-D., Lamb, A., & Chen, L.-F. (2010). Posttranslational modifications of NF- $\kappa$ B: Another layer of regulation for NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cellular signalling*, *22*(9), 1282-1290. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.03.017>
- Huang, C.-Z., Yu, T., & Chen, Q.-K. (2015). DNA Methylation Dynamics During Differentiation, Proliferation, and Tumorigenesis in the Intestinal Tract. *Stem Cells and Development*, *24*(23), 2733-2739. <https://doi.org/10.1089/scd.2015.0235>
- Huang, H., Liu, J.-Q., Yu, Y., Mo, L.-H., Ge, R.-T., Zhang, H.-P., Liu, Z.-G., Zheng, P.-Y., & Yang, P.-C. (2016). Regulation of TWIK-related potassium channel-1 (Trek1) restitutes intestinal epithelial barrier function. *Cellular and Molecular Immunology*, *13*(1), 110-118. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.137>
- Huang, S., Ma, J., Zhu, M., & Ran, Z. (2017). Status of serum vitamin B12 and folate in patients with inflammatory bowel disease in China. *Intestinal Research*, *15*(1), 103-108. <https://doi.org/10.5217/ir.2017.15.1.103>
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.-F., & Yao, T.-P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, *417*(6887), 455-458. <https://doi.org/10.1038/417455a>

- Hudson, G. M., Watson, P. J., Fairall, L., Jamieson, A. G., & Schwabe, J. W. R. (2015). Insights into the Recruitment of Class IIa Histone Deacetylases (HDACs) to the SMRT/NCoR Transcriptional Repression Complex. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(29), 18237-18244. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.661058>
- Hug, B. A., & Lazar, M. A. (2004). ETO interacting proteins. *Oncogene*, *23*(24), 4270-4274. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207674>
- Hugon, P., Dufour, J.-C., Colson, P., Fournier, P.-E., Sallah, K., & Raoult, D. (2015). A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *The Lancet. Infectious Diseases*, *15*(10), 1211-1219. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00293-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00293-5)
- Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M., & Thomas, G. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, *411*(6837), 599-603. <https://doi.org/10.1038/35079107>
- Hugot, J.-P., Alberti, C., Berrebi, D., Bingen, E., & Cézard, J.-P. (2003). Crohn's disease : The cold chain hypothesis. *The Lancet*, *362*(9400), 2012-2015. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)15024-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15024-6)
- Hugot, J.-P., Zaccaria, I., Cavanaugh, J., Yang, H., Vermeire, S., Lappalainen, M., Schreiber, S., Annese, V., Jewell, D. P., Fowler, E. V., Brant, S. R., Silverberg, M. S., Cho, J., Rioux, J. D., Satsangi, J., Parkes, M., & IBD International Genetics Consortium. (2007). Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in Caucasian healthy people. *The American Journal of Gastroenterology*, *102*(6), 1259-1267. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01149.x>
- Hulten, K., El-Zimaity, H. M., Karttunen, T. J., Almashhrawi, A., Schwartz, M. R., Graham, D. Y., & El-Zaatari, F. A. (2001). Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Crohn's diseased tissues by in situ hybridization. *The American Journal of Gastroenterology*, *96*(5), 1529-1535. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.03751.x>
- Hussain, M. M., & Pan, X. (2009). Clock genes, intestinal transport and plasma lipid homeostasis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, *20*(4), 177-185. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.01.001>
- Ideraabdullah, F. Y., & Zeisel, S. H. (2018). Dietary Modulation of the Epigenome. *Physiological Reviews*, *98*(2), 667-695. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2017>
- Imai, T., Inoue, R., Nishida, A., Yokota, Y., Morishima, S., Kawahara, M., Kusada, H., Tamaki, H., & Andoh, A. (2022). Features of the gut prokaryotic virome of Japanese patients with Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1007/s00535-022-01882-8>
- Imhann, F., Vila, A. V., Bonder, M. J., Fu, J., Gevers, D., Visschedijk, M. C., Spekhorst, L. M., Alberts, R., Franke, L., van Dullemen, H. M., Ter Steege, R. W. F., Huttenhower, C., Dijkstra, G., Xavier, R. J., Festen, E. A. M., Wijmenga, C., Zhernakova, A., & Weersma, R. K. (2018). The Interplay of Host Genetics and the Gut Microbiota Underlying the Onset and Clinical Presentation of Inflammatory Bowel Disease. *Gut*, *67*(1), 108-119. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312135>
- Irvine, E. J., & Marshall, J. K. (2000). Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology*, *119*(6), 1740-1744. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.20231>
- Jacobsen, S. C., Brøns, C., Bork-Jensen, J., Ribel-Madsen, R., Yang, B., Lara, E., Hall, E., Calvanese, V., Nilsson, E., Jørgensen, S. W., Mandrup, S., Ling, C., Fernandez, A. F., Fraga, M. F., Poulsen, P., & Vaag, A. (2012). Effects of short-term high-fat overfeeding on genome-wide DNA methylation in the skeletal muscle of healthy young men. *Diabetologia*, *55*(12), 3341-3349. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2717-8>
- Jambhekar, A., Dhall, A., & Shi, Y. (2019). Roles and regulation of histone methylation in animal development. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *20*(10), 625-641. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0151-1>

- James, J. P., Riis, L. B., Malham, M., Høgdall, E., Langholz, E., & Nielsen, B. S. (2020). MicroRNA Biomarkers in IBD—Differential Diagnosis and Prediction of Colitis-Associated Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21), 7893. <https://doi.org/10.3390/ijms21217893>
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *21*(29), 8787-8803. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
- Jenkins, R. T., Jones, D. B., Goodacre, R. L., Collins, S. M., Coates, G., Hunt, R. H., & Bienenstock, J. (1987). Reversibility of increased intestinal permeability to 51Cr-EDTA in patients with gastrointestinal inflammatory diseases. *The American Journal of Gastroenterology*, *82*(11), 1159-1164.
- Jenkins, R. T., Ramage, J. K., Jones, D. B., Collins, S. M., Goodacre, R. L., & Hunt, R. H. (1988). Small bowel and colonic permeability to 51Cr-EDTA in patients with active inflammatory bowel disease. *Clinical and Investigative Medicine. Medecine Clinique Et Experimentale*, *11*(2), 151-155.
- Ji, M., Lee, E. J., Kim, K. B., Kim, Y., Sung, R., Lee, S.-J., Kim, D. S., & Park, S. M. (2015). HDAC inhibitors induce epithelial-mesenchymal transition in colon carcinoma cells. *Oncology Reports*, *33*(5), 2299-2308. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3879>
- Jiang, Y., & Wang, L. (2016). Role of histone deacetylase 3 in ankylosing spondylitis via negative feedback loop with microRNA-130a and enhancement of tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in peripheral blood mononuclear cells. *Molecular Medicine Reports*, *13*(1), 35-40. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4494>
- Jigarano, A. O., Nedelciuc, O., Blaj, A., Badea, M., Mihai, C., Diculescu, M., & Cijevschi-Prelicean, C. (2014). Is rifaximin effective in maintaining remission in Crohn's disease? *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, *32*(4), 378-383. <https://doi.org/10.1159/000358141>
- Jin, Z., Jiang, W., Jiao, F., Guo, Z., Hu, H., Wang, L., & Wang, L. (2014). Decreased expression of histone deacetylase 10 predicts poor prognosis of gastric cancer patients. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *7*(9), 5872-5879.
- Jo, K., Kim, E. J., Yu, H. J., & Kim, C.-H. Y. and D. W. (2017). *Host Cell Nuclear Localization of Shigella flexneri Effector OspF Is Facilitated by SUMOylation*. *27*(3), 610-615. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11066>
- Joehanes, R., Just, A. C., Marioni, R. E., Pilling, L. C., Reynolds, L. M., Mandaviya, P. R., Guan, W., Xu, T., Elks, C. E., Aslibekyan, S., Moreno-Macias, H., Smith, J. A., Brody, J. A., Dhingra, R., Yousefi, P., Pankow, J. S., Kunze, S., Shah, S. H., McRae, A. F., ... London, S. J. (2016). Epigenetic Signatures of Cigarette Smoking. *Circulation. Cardiovascular Genetics*, *9*(5), 436-447. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.116.001506>
- Johnson, A. M. F., Costanzo, A., Gareau, M. G., Armando, A. M., Quehenberger, O., Jameson, J. M., & Olefsky, J. M. (2015). High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability. *PloS One*, *10*(4), e0122195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122195>
- Johnson, C. A., White, D. A., Lavender, J. S., O'Neill, L. P., & Turner, B. M. (2002). Human class I histone deacetylase complexes show enhanced catalytic activity in the presence of ATP and co-immunoprecipitate with the ATP-dependent chaperone protein Hsp70. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(11), 9590-9597. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107942200>
- Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Vandamme, P., & Vermeire, S. (2011). Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*, *60*(5), 631-637. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.223263>
- Joosten, L. A., Leoni, F., Meghji, S., & Mascagni, P. (2011). Inhibition of HDAC Activity by ITF2357 Ameliorates Joint Inflammation and Prevents Cartilage and Bone Destruction in Experimental Arthritis. *Molecular Medicine*, *17*(5-6), 391-396. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00058>



- Jose, L., Ramachandran, R., Bhagavat, R., Gomez, R. L., Chandran, A., Raghunandan, S., Omkumar, R. V., Chandra, N., Mundayoor, S., & Kumar, R. A. (2016). Hypothetical protein Rv3423.1 of *Mycobacterium tuberculosis* is a histone acetyltransferase. *The FEBS Journal*, *283*(2), 265-281. <https://doi.org/10.1111/febs.13566>
- Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R. K., Duerr, R. H., McGovern, D. P., Hui, K. Y., Lee, J. C., Schumm, L. P., Sharma, Y., Anderson, C. A., Essers, J., Mitrovic, M., Ning, K., Cleynen, I., Theatre, E., Spain, S. L., Raychaudhuri, S., Goyette, P., Wei, Z., ... Cho, J. H. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, *491*(7422), 119-124. <https://doi.org/10.1038/nature11582>
- Jung, H., Kim, J. S., Lee, K. H., Tizaoui, K., Terrazzino, S., Cargnin, S., Smith, L., Koyanagi, A., Jacob, L., Li, H., Hong, S. H., Yon, D. K., Lee, S. W., Kim, M. S., Wasuwanich, P., Karnsakul, W., Shin, J. I., & Kronbichler, A. (2021). Roles of microRNAs in inflammatory bowel disease. *International Journal of Biological Sciences*, *17*(8), 2112-2123. <https://doi.org/10.7150/ijbs.59904>
- Jung, K. H., Noh, J. H., Kim, J. K., Eun, J. W., Bae, H. J., Xie, H. J., Chang, Y. G., Kim, M. G., Park, H., Lee, J. Y., & Nam, S. W. (2012). HDAC2 overexpression confers oncogenic potential to human lung cancer cells by deregulating expression of apoptosis and cell cycle proteins. *Journal of Cellular Biochemistry*, *113*(6), 2167-2177. <https://doi.org/10.1002/jcb.24090>
- Jung, M., Hoffmann, K., Brosch, G., & Loidl, P. (1997). Analogues of trichostatin A and trapoxin B as histone deacetylase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *7*(13), 1655-1658. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(97\)00284-9](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(97)00284-9)
- Kadosh, E., Snir-Alkalay, I., Venkatachalam, A., May, S., Lasry, A., Elyada, E., Zinger, A., Shaham, M., Vaalani, G., Mernberger, M., Stiewe, T., Pikarsky, E., Oren, M., & Ben-Neriah, Y. (2020). The gut microbiome switches mutant p53 from tumour-suppressive to oncogenic. *Nature*, *586*(7827), 133-138. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2541-0>
- Kalla, R., Ventham, N. T., Kennedy, N. A., Quintana, J. F., Nimmo, E. R., Buck, A. H., & Satsangi, J. (2015). MicroRNAs : New players in IBD. *Gut*, *64*(3), 504-513. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307891>
- Kallinowski, F., Wassmer, A., Hofmann, M. A., Harmsen, D., Heesemann, J., Karch, H., Herfarth, C., & Buhr, H. J. (1998). Prevalence of enteropathogenic bacteria in surgically treated chronic inflammatory bowel disease. *Hepato-Gastroenterology*, *45*(23), 1552-1558.
- Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Chinen, H., Kobayashi, T., Sato, T., Sakuraba, A., Kitazume, M. T., Sugita, A., Koganei, K., Akagawa, K. S., & Hibi, T. (2008). Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(6), 2269-2280. <https://doi.org/10.1172/JCI34610>
- Kamali Dolatabadi, R., Feizi, A., Halaji, M., Fazeli, H., & Adibi, P. (2021). The Prevalence of Adherent-Invasive *Escherichia coli* and Its Association With Inflammatory Bowel Diseases : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Medicine*, *8*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.730243>
- Kamen, D. L., & Tangpricha, V. (2010). Vitamin D and molecular actions on the immune system : Modulation of innate and autoimmunity. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *88*(5), 441-450. <https://doi.org/10.1007/s00109-010-0590-9>
- Kaplan, G. G., Hubbard, J., Korzenik, J., Sands, B. E., Panaccione, R., Ghosh, S., Wheeler, A. J., & Villeneuve, P. J. (2010). The Inflammatory Bowel Diseases and Ambient Air Pollution : A Novel Association. *The American Journal of Gastroenterology*, *105*(11), 2412-2419. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.252>
- Kaplan, G. G., & Ng, S. C. (2016). Globalisation of inflammatory bowel disease : Perspectives from the evolution of inflammatory bowel disease in the UK and China. *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, *1*(4), 307-316. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30077-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30077-2)



- Kaspar, D., Hastreiter, S., Irmeler, M., Hrabé de Angelis, M., & Beckers, J. (2020). Nutrition and its role in epigenetic inheritance of obesity and diabetes across generations. *Mammalian Genome*, 31(5), 119-133. <https://doi.org/10.1007/s00335-020-09839-z>
- Kato, H., Tamamizu-Kato, S., & Shibasaki, F. (2004). Histone deacetylase 7 associates with hypoxia-inducible factor 1alpha and increases transcriptional activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 41966-41974. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406320200>
- Kaur, G., Bagam, P., Pinkston, R., Singh, D. P., & Batra, S. (2018). Cigarette smoke-induced inflammation : NLRP10-mediated mechanisms. *Toxicology*, 398-399, 52-67. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.02.010>
- Kaur, G., Begum, R., Thota, S., & Batra, S. (2019). A systematic review of smoking-related epigenetic alterations. *Archives of Toxicology*, 93(10), 2715-2740. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02562-y>
- Keita, Å. V., Alkaissi, L. Y., Holm, E. B., Heil, S. D. S., Chassaing, B., Darfeuille-Michaud, A., McKay, D. M., & Söderholm, J. D. (2020). Enhanced E. coli LF82 Translocation through the Follicle-associated Epithelium in Crohn's Disease is Dependent on Long Polar Fimbriae and CEACAM6 expression, and Increases Paracellular Permeability. *Journal of Crohn's & Colitis*, 14(2), 216-229. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz144>
- Kelly, C. J., Zheng, L., Campbell, E. L., Saeedi, B., Scholz, C. C., Bayless, A. J., Wilson, K. E., Glover, L. E., Kominsky, D. J., Magnuson, A., Weir, T. L., Ehrentraut, S. F., Pickel, C., Kuhn, K. A., Lanis, J. M., Nguyen, V., Taylor, C. T., & Colgan, S. P. (2015). Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. *Cell Host & Microbe*, 17(5), 662-671. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.03.005>
- Kelly, D., Kotliar, M., Woo, V., Jagannathan, S., Whitt, J., Moncivaiz, J., Aronow, B. J., Dubinsky, M. C., Hyams, J. S., Markowitz, J. F., Baldassano, R. N., Stephens, M. C., Walters, T. D., Kugathasan, S., Haberman, Y., Sundaram, N., Rosen, M. J., Helmrath, M., Karns, R., ... Alenghat, T. (2018). Microbiota-sensitive epigenetic signature predicts inflammation in Crohn's disease. *JCI Insight*, 3(18), 122104. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.122104>
- Kempinska-Podhorodecka, A., Adamowicz, M., Ostrycharz, E., Chmielarz, M., Wójcicki, M., Milkiewicz, P., & Milkiewicz, M. (2021). Role of miR-506 in ulcerative colitis associated with primary sclerosing cholangitis. *Scientific Reports*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89631-4>
- Khalafi, M., & Symonds, M. E. (2020). The impact of high-intensity interval training on inflammatory markers in metabolic disorders : A meta-analysis. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 30(11), 2020-2036. <https://doi.org/10.1111/sms.13754>
- Khalili, H., Ananthakrishnan, A. N., Konijeti, G. G., Liao, X., Higuchi, L. M., Fuchs, C. S., Spiegelman, D., Richter, J. M., Korzenik, J. R., & Chan, A. T. (2013). Physical activity and risk of inflammatory bowel disease : Prospective study from the Nurses' Health Study cohorts. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 347, f6633. <https://doi.org/10.1136/bmj.f6633>
- Khan, K. J., Ullman, T. A., Ford, A. C., Abreu, M. T., Abadir, A., Abadir, A., Marshall, J. K., Talley, N. J., & Moayyedi, P. (2011). Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease : A systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology*, 106(4), 661-673. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.72>
- Khanna, R., Bressler, B., Levesque, B. G., Zou, G., Stitt, L. W., Greenberg, G. R., Panaccione, R., Bitton, A., Paré, P., Vermeire, S., D'Haens, G., MacIntosh, D., Sandborn, W. J., Donner, A., Vandervoort, M. K., Morris, J. C., Feagan, B. G., & REACT Study Investigators. (2015). Early combined immunosuppression for the management of Crohn's disease (REACT): A cluster randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, 386(10006), 1825-1834. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00068-9)
- Kibe, K., Shirane, K., Ohishi, H., Uemura, S., Toh, H., & Sasaki, H. (2021). The DNMT3A PWWP domain is essential for the normal DNA methylation landscape in mouse somatic cells and oocytes. *PLoS Genetics*, 17(5), e1009570. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009570>

- Kim, H.-J., & Bae, S.-C. (2011). Histone deacetylase inhibitors : Molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *American Journal of Translational Research*, 3(2), 166-179.
- Kim, J. K., Noh, J. H., Eun, J. W., Jung, K. H., Bae, H. J., Shen, Q., Kim, M. G., Chang, Y. G., Kim, S.-J., Park, W. S., Lee, J. Y., Borlak, J., & Nam, S. W. (2013). Targeted inactivation of HDAC2 restores p16INK4a activity and exerts antitumor effects on human gastric cancer. *Molecular Cancer Research: MCR*, 11(1), 62-73. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0332>
- Kim, K.-A., Gu, W., Lee, I.-A., Joh, E.-H., & Kim, D.-H. (2012). High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PloS One*, 7(10), e47713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047713>
- Kim, S., Eun, H. S., & Jo, E.-K. (2019). Roles of Autophagy-Related Genes in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Cells*, 8(1), 77. <https://doi.org/10.3390/cells8010077>
- Kim, Y. K., Shin, J.-S., & Nahm, M. H. (2016). NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Medical Journal*, 57(1), 5-14. <https://doi.org/10.3349/yjmj.2016.57.1.5>
- Kirpich, I., Ghare, S., Zhang, J., Gobejishvili, L., Kharebava, G., Barve, S. J., Barker, D., Moghe, A., McClain, C., & Barve, S. (2012). Binge Alcohol-Induced Microvesicular Liver Steatosis and Injury are Associated with Down-Regulation of Hepatic Hdac 1, 7, 9, 10, 11 and Up-Regulation of Hdac 3. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 36(9), 1578-1586. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2012.01751.x>
- Kitamoto, S., Alteri, C. J., Rodrigues, M., Nagao-Kitamoto, H., Sugihara, K., Himpfl, S. D., Bazzi, M., Miyoshi, M., Nishioka, T., Hayashi, A., Morhardt, T. L., Kuffa, P., Grasberger, H., El-Zaatari, M., Bishu, S., Ishii, C., Hirayama, A., Eaton, K. A., Dogan, B., ... Kamada, N. (2020). Dietary L-serine confers a competitive fitness advantage to Enterobacteriaceae in the inflamed gut. *Nature Microbiology*, 5(1), 116-125. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0591-6>
- Knights, D., Silverberg, M. S., Weersma, R. K., Gevers, D., Dijkstra, G., Huang, H., Tyler, A. D., van Sommeren, S., Imhann, F., Stempak, J. M., Huang, H., Vangay, P., Al-Ghalith, G. A., Russell, C., Sauk, J., Knight, J., Daly, M. J., Huttenhower, C., & Xavier, R. J. (2014). Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease. *Genome Medicine*, 6(12), 107. <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0107-1>
- Knösel, T., Schewe, C., Petersen, N., Dietel, M., & Petersen, I. (2009). Prevalence of infectious pathogens in Crohn's disease. *Pathology, Research and Practice*, 205(4), 223-230. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2008.04.018>
- Kohli, R. M., & Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502(7472), 472-479. <https://doi.org/10.1038/nature12750>
- Kok, D. E., Steegenga, W. T., & McKay, J. A. (2018). Folate and epigenetics : Why we should not forget bacterial biosynthesis. *Epigenomics*, 10(9), 1147-1150. <https://doi.org/10.2217/epi-2018-0117>
- Kok, D. E., Steegenga, W. T., Smid, E. J., Zoetendal, E. G., Ulrich, C. M., & Kampman, E. (2020). Bacterial folate biosynthesis and colorectal cancer risk : More than just a gut feeling. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(2), 244-256. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1522499>
- Koprinarova, M., Botev, P., & Russev, G. (2011). Histone deacetylase inhibitor sodium butyrate enhances cellular radiosensitivity by inhibiting both DNA nonhomologous end joining and homologous recombination. *DNA Repair*, 10(9), 970-977. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.07.003>
- Korfei, M., Mahavadi, P., & Guenther, A. (2022). Targeting Histone Deacetylases in Idiopathic Pulmonary Fibrosis : A Future Therapeutic Option. *Cells*, 11(10), 1626. <https://doi.org/10.3390/cells11101626>
- Kosinsky, R. L., Zerche, M., Kutschat, A. P., Nair, A., Ye, Z., Saul, D., von Heesen, M., Fritton, J. J., Schwarzer, A. C., Paglilla, N., Sheikh, S. Z., Wegwitz, F., Sun, Z., Ghadimi, M., Newberry, R. D., Sartor, R. B., Faubion, W. A., & Johnsen, S. A. (2021). RNF20 and RNF40 regulate vitamin D receptor-dependent signaling in inflammatory bowel disease. *Cell Death & Differentiation*, 28(11), 11. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00808-w>

- Kotlowski, R., Bernstein, C. N., Sepehri, S., & Krause, D. O. (2007). High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut*, *56*(5), 669-675. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.099796>
- Kovacs, J. J., Murphy, P. J. M., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.-T., Nicchitta, C. V., Yoshida, M., Toft, D. O., Pratt, W. B., & Yao, T.-P. (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Molecular Cell*, *18*(5), 601-607. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.04.021>
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2011). miRBase : Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*, *39*(Database issue), D152-D157. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1027>
- Kraiczky, J., Nayak, K., Ross, A., Raine, T., Mak, T. N., Gasparetto, M., Cario, E., Rakyán, V., Heuschkel, R., & Zilbauer, M. (2016). Assessing DNA methylation in the developing human intestinal epithelium : Potential link to inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunology*, *9*(3), 3. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.88>
- Krauss, E., Agaimy, A., Neumann, H., Schulz, U., Kessler, H., Hartmann, A., Neurath, M. F., Raithele, M., & Mudter, J. (2012). Characterization of lymphoid follicles with red ring signs as first manifestation of early Crohn's disease by conventional histopathology and confocal laser endomicroscopy. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *5*(5), 411-421.
- Krautkramer, K. A., Kreznar, J. H., Romano, K. A., Vivas, E. I., Barrett-Wilt, G. A., Rabaglia, M. E., Keller, M. P., Attie, A. D., Rey, F. E., & Denu, J. M. (2016). Diet-microbiota interactions mediate global epigenetic programming in multiple host tissues. *Molecular cell*, *64*(5), 982-992. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.025>
- Kronman, M. P., Zaoutis, T. E., Haynes, K., Feng, R., & Coffin, S. E. (2012). Antibiotic exposure and IBD development among children : A population-based cohort study. *Pediatrics*, *130*(4), e794-803. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-3886>
- Kuang, Z., Wang, Y., Li, Y., Ye, C., Ruhn, K. A., Behrendt, C. L., Olson, E. N., & Hooper, L. V. (2019). The intestinal microbiota programs diurnal rhythms in host metabolism through histone deacetylase 3. *Science (New York, N.Y.)*, *365*(6460), 1428-1434. <https://doi.org/10.1126/science.aaw3134>
- Kuballa, P., Huett, A., Rioux, J. D., Daly, M. J., & Xavier, R. J. (2008). Impaired Autophagy of an Intracellular Pathogen Induced by a Crohn's Disease Associated ATG16L1 Variant. *PLoS ONE*, *3*(10), e3391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003391>
- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., & Maleszka, R. (2008). Nutritional Control of Reproductive Status in Honeybees via DNA Methylation. *Science*, *319*(5871), 1827-1830. <https://doi.org/10.1126/science.1153069>
- Kudelka, M. R., Stowell, S. R., Cummings, R. D., & Neish, A. S. (2020). Intestinal epithelial glycosylation in homeostasis and gut microbiota interactions in IBD. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, *17*(10), 597-617. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0331-7>
- Kumar, H., Lund, R., Laiho, A., Lundelin, K., Ley, R. E., Isolauri, E., & Salminen, S. (2014). Gut Microbiota as an Epigenetic Regulator : Pilot Study Based on Whole-Genome Methylation Analysis. *mBio*, *5*(6), e02113-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02113-14>
- Lacher, M., Schroepf, S., Ballauff, A., Lohse, P., von Schweinitz, D., Kappler, R., & Koletzko, S. (2009). Autophagy 16-like 1 rs2241880 G allele is associated with Crohn's disease in German children. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, *98*(11), 1835-1840. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2009.01438.x>
- Lagishetty, V., Misharin, A. V., Liu, N. Q., Lisse, T. S., Chun, R. F., Ouyang, Y., McLachlan, S. M., Adams, J. S., & Hewison, M. (2010). Vitamin D deficiency in mice impairs colonic antibacterial activity and predisposes to colitis. *Endocrinology*, *151*(6), 2423-2432. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0089>
- Laharie, D., Debeugny, S., Peeters, M., Van Gossum, A., Gower-Rousseau, C., Bélaïche, J., Fiasse, R., Dupas, J. L., Lerebours, E., Piotte, S., Cortot, A., Vermeire, S., Grandbastien, B., & Colombel, J. F. (2001). Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. *Gastroenterology*, *120*(4), 816-819. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.22574>

- Lahm, A., Paolini, C., Pallaoro, M., Nardi, M. C., Jones, P., Neddermann, P., Sambucini, S., Bottomley, M. J., Lo Surdo, P., Carfi, A., Koch, U., De Francesco, R., Steinkühler, C., & Gallinari, P. (2007). Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(44), 17335-17340. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706487104>
- Lakatos, P. L., Vegh, Z., Lovasz, B. D., David, G., Pandur, T., Erdelyi, Z., Szita, I., Mester, G., Balogh, M., Szipocs, I., Molnar, C., Komaromi, E., Golovics, P. A., Mandel, M., Horvath, A., Szathmari, M., Kiss, L. S., & Lakatos, L. (2013). Is current smoking still an important environmental factor in inflammatory bowel diseases? Results from a population-based incident cohort. *Inflammatory Bowel Diseases*, *19*(5), 1010-1017. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e3182802b3e>
- Lamas, B., Richard, M. L., Leducq, V., Pham, H.-P., Michel, M.-L., Da Costa, G., Bridonneau, C., Jegou, S., Hoffmann, T. W., Natividad, J. M., Brot, L., Taleb, S., Couturier-Maillard, A., Nion-Larmurier, I., Merabtene, F., Seksik, P., Bourrier, A., Cosnes, J., Ryffel, B., ... Sokol, H. (2016). CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nature medicine*, *22*(6), 598-605. <https://doi.org/10.1038/nm.4102>
- Lamers, C. R., de Roos, N. M., Koppelman, L. J. M., Hopman, M. T. E., & Witteman, B. J. M. (2021). Patient experiences with the role of physical activity in inflammatory bowel disease: Results from a survey and interviews. *BMC Gastroenterology*, *21*(1), 172. <https://doi.org/10.1186/s12876-021-01739-z>
- Lamps, L. W., Madhusudhan, K. T., Havens, J. M., Greenson, J. K., Bronner, M. P., Chiles, M. C., Dean, P. J., & Scott, M. A. (2003). Pathogenic *Yersinia* DNA is detected in bowel and mesenteric lymph nodes from patients with Crohn's disease. *The American Journal of Surgical Pathology*, *27*(2), 220-227. <https://doi.org/10.1097/00000478-200302000-00011>
- Lapaquette, P., Bringer, M.-A., & Darfeuille-Michaud, A. (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, P., Glasser, A.-L., Huett, A., Xavier, R. J., & Darfeuille-Michaud, A. (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>
- Larabi, A., Barnich, N., & Nguyen, H. T. T. (2019). New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD. *Autophagy*, *16*(1), 38-51. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1635384>
- Larabi, A., Salesse, L., Cordonnier, C., Etienne-Mesmin, L., Barnich, N., Dalmasso, G., & Nguyen, H. T. T. (2020). Differential miRNA-Gene Expression in M Cells in Response to Crohn's Disease-Associated AIEC. *Microorganisms*, *8*(8), 1205. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081205>
- Las Heras, V., Clooney, A. G., Ryan, F. J., Cabrera-Rubio, R., Casey, P. G., Hueston, C. M., Pinheiro, J., Rudkin, J. K., Melgar, S., Cotter, P. D., Hill, C., & Gahan, C. G. M. (2019). Short-term consumption of a high-fat diet increases host susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiome*, *7*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0621-x>
- Lassen, K. G., Kuballa, P., Conway, K. L., Patel, K. K., Becker, C. E., Peloquin, J. M., Villablanca, E. J., Norman, J. M., Liu, T.-C., Heath, R. J., Becker, M. L., Fagbami, L., Horn, H., Mercer, J., Yilmaz, O. H., Jaffe, J. D., Shamji, A. F., Bhan, A. K., Carr, S. A., ... Xavier, R. J. (2014). Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(21), 7741-7746. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407001111>
- Laudisi, F., Di Fusco, D., Dinallo, V., Stolfi, C., Di Grazia, A., Marafini, I., Colantoni, A., Ortenzi, A., Alteri, C., Guerrieri, F., Mavilio, M., Ceccherini-Silberstein, F., Federici, M., MacDonald, T. T., Monteleone, I., & Monteleone, G. (2019). The Food Additive Maltodextrin Promotes Endoplasmic Reticulum Stress-Driven Mucus Depletion and Exacerbates Intestinal Inflammation. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, *7*(2), 457-473. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.09.002>



- Lawrence, M., Daujat, S., & Schneider, R. (2016). Lateral Thinking : How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends in Genetics*, 32(1), 42-56. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.007>
- Le Baut, G., O'Brien, C., Pavli, P., Roy, M., Seksik, P., Tréton, X., Nancey, S., Barnich, N., Bezault, M., Auzolle, C., Cazals-Hatem, D., Viala, J., Allez, M., Hugot, J.-P., & Dumay, A. (2018). Prevalence of Yersinia Species in the Ileum of Crohn's Disease Patients and Controls. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 336. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00336>
- LeBlanc, J. G., Laiño, J. E., del Valle, M. J., Vannini, V., van Sinderen, D., Taranto, M. P., de Valdez, G. F., de Giori, G. S., & Sesma, F. (2011). B-group vitamin production by lactic acid bacteria—Current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*, 111(6), 1297-1309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x>
- Lebreton, A., Lakisic, G., Job, V., Fritsch, L., Tham, T. N., Camejo, A., Matteï, P.-J., Regnault, B., Nahori, M.-A., Cabanes, D., Gautreau, A., Ait-Si-Ali, S., Dessen, A., Cossart, P., & Bierne, H. (2011). A Bacterial Protein Targets the BAHD1 Chromatin Complex to Stimulate Type III Interferon Response. *Science*, 331(6022), 1319-1321. <https://doi.org/10.1126/science.1200120>
- Lee, C., Kim, B. G., Kim, J. H., Chun, J., Im, J. P., & Kim, J. S. (2017). Sodium butyrate inhibits the NF-kappa B signaling pathway and histone deacetylation, and attenuates experimental colitis in an IL-10 independent manner. *International Immunopharmacology*, 51, 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.07.023>
- Lee, H., Rezai-Zadeh, N., & Seto, E. (2004). Negative Regulation of Histone Deacetylase 8 Activity by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase A. *Molecular and Cellular Biology*, 24(2), 765-773. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.2.765-773.2004>
- Lee, J. W., Lee, S.-M., Chun, J., Im, J. P., Seo, S.-K., Ha, N., il Choi, Y., & Kim, J. S. (2020). Novel Histone Deacetylase 6 Inhibitor CKD-506 Inhibits NF-κB Signaling in Intestinal Epithelial Cells and Macrophages and Ameliorates Acute and Chronic Murine Colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 26(6), 852-862. <https://doi.org/10.1093/ibd/izz317>
- Lee, K. K., & Workman, J. L. (2007). Histone acetyltransferase complexes : One size doesn't fit all. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(4), 284-295. <https://doi.org/10.1038/nrm2145>
- Lee, K., Whedon, S. D., Wang, Z. A., & Cole, P. A. (2022). Distinct biochemical properties of the class I histone deacetylase complexes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 70, 102179. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2022.102179>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y)
- Lee, S. H. (2015). Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction : Implication on Inflammatory Bowel Diseases. *Intestinal Research*, 13(1), 11-18. <https://doi.org/10.5217/ir.2015.13.1.11>
- Lee, Y. H., & Song, G. G. (2012). Pathway analysis of a genome-wide association study of ileal Crohn's disease. *DNA and Cell Biology*, 31(10), 1549-1554. <https://doi.org/10.1089/dna.2012.1605>
- Leoni, F., Fossati, G., Lewis, E. C., Lee, J.-K., Porro, G., Pagani, P., Modena, D., Moras, M. L., Pozzi, P., Reznikov, L. L., Siegmund, B., Fantuzzi, G., Dinarello, C. A., & Mascagni, P. (2005). The Histone Deacetylase Inhibitor ITF2357 Reduces Production of Pro-Inflammatory Cytokines In Vitro and Systemic Inflammation In Vivo. *Molecular Medicine*, 11(1-12), 1-15. <https://doi.org/10.2119/2006-00005.Dinarello>
- Leu, S. B., Shulman, S. C., Steelman, C. K., Lamps, L. W., Bulut, O. P., Abramowsky, C. R., Gold, B. D., Szlam, S., Stockwell, C., Havens, J., Kolta, S., & Shehata, B. M. (2013). Pathogenic Yersinia DNA in intestinal specimens of pediatric patients with Crohn's disease. *Fetal and Pediatric Pathology*, 32(5), 367-370. <https://doi.org/10.3109/15513815.2013.768744>
- Leung, A., Trac, C., Du, J., Natarajan, R., & Schones, D. E. (2016). Persistent Chromatin Modifications Induced by High Fat Diet. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(20), 10446-10455. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.711028>



- Leus, N. G. J., van den Bosch, T., van der Wouden, P. E., Krist, K., Ourailidou, M. E., Eleftheriadis, N., Kistemaker, L. E. M., Bos, S., Gjaltema, R. A. F., Mekonnen, S. A., Bischoff, R., Gosens, R., Haisma, H. J., & Dekker, F. J. (2017). HDAC1-3 inhibitor MS-275 enhances IL10 expression in RAW264.7 macrophages and reduces cigarette smoke-induced airway inflammation in mice. *Scientific Reports*, *7*(1), 1. <https://doi.org/10.1038/srep45047>
- Leviatan, S., Shoer, S., Rothschild, D., Gorodetski, M., & Segal, E. (2022). An expanded reference map of the human gut microbiome reveals hundreds of previously unknown species. *Nature Communications*, *13*(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31502-1>
- Li, B., Zhang, L., Zhu, L., Cao, Y., Dou, Z., & Yu, Q. (2021). HDAC5 promotes intestinal sepsis via the Ghrelin/E2F1/NF- $\kappa$ B axis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *35*(7), e21368. <https://doi.org/10.1096/fj.202001584R>
- Li, C., Chen, Y., Zhu, H., Zhang, X., Han, L., Zhao, Z., Wang, J., Ning, L., Zhou, W., Lu, C., Xu, L., Sang, J., Feng, Z., Zhang, Y., Lou, X., Bo, X., Zhu, B., Yu, C., Zheng, M., ... Shen, Z. (2020). Inhibition of Histone Deacetylation by MS-275 Alleviates Colitis by Activating the Vitamin D Receptor. *Journal of Crohn's and Colitis*, *14*(8), 1103-1118. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjaa016>
- Li, E., Hamm, C. M., Gulati, A. S., Sartor, R. B., Chen, H., Wu, X., Zhang, T., Rohlf, F. J., Zhu, W., Gu, C., Robertson, C. E., Pace, N. R., Boedeker, E. C., Harpaz, N., Yuan, J., Weinstock, G. M., Sodergren, E., & Frank, D. N. (2012). Inflammatory Bowel Diseases Phenotype, *C. difficile* and NOD2 Genotype Are Associated with Shifts in Human Ileum Associated Microbial Composition. *PLoS ONE*, *7*(6), e26284. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026284>
- Li, G., Lin, J., Zhang, C., Gao, H., Lu, H., Gao, X., Zhu, R., Li, Z., Li, M., & Liu, Z. (2021). Microbiota metabolite butyrate constrains neutrophil functions and ameliorates mucosal inflammation in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*, *13*(1), 1968257. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1968257>
- Li, H., Xu, H., Zhou, Y., Zhang, J., Long, C., Li, S., Chen, S., Zhou, J.-M., & Shao, F. (2007). The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science (New York, N.Y.)*, *315*(5814), 1000-1003. <https://doi.org/10.1126/science.1138960>
- Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arumugam, M., Kultima, J. R., Prifti, E., Nielsen, T., Juncker, A. S., Manichanh, C., Chen, B., Zhang, W., Levenez, F., Wang, J., Xu, X., Xiao, L., Liang, S., ... MetaHIT Consortium. (2014). An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nature Biotechnology*, *32*(8), 834-841. <https://doi.org/10.1038/nbt.2942>
- Li, J., Pan, X., Ren, Z., Li, B., Liu, H., Wu, C., Dong, X., de Vos, P., Pan, L.-L., & Sun, J. (2022). Protein arginine methyltransferase 2 (PRMT2) promotes dextran sulfate sodium-induced colitis by inhibiting the SOCS3 promoter via histone H3R8 asymmetric dimethylation. *British Journal of Pharmacology*, *179*(1), 141-158. <https://doi.org/10.1111/bph.15695>
- Li, M., Yang, L., Mu, C., Sun, Y., Gu, Y., Chen, D., Liu, T., & Cao, H. (2022). Gut microbial metabolome in inflammatory bowel disease : From association to therapeutic perspectives. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *20*, 2402-2414. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.03.038>
- Li, Q., Wang, C., Tang, C., He, Q., Li, N., & Li, J. (2014). Dysbiosis of Gut Fungal Microbiota is Associated With Mucosal Inflammation in Crohn's Disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *48*(6), 513-523. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000035>
- Li, S., Wong, E. M., Bui, M., Nguyen, T. L., Joo, J.-H. E., Stone, J., Dite, G. S., Giles, G. G., Saffery, R., Southey, M. C., & Hopper, J. L. (2018). Causal effect of smoking on DNA methylation in peripheral blood : A twin and family study. *Clinical Epigenetics*, *10*, 18. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0452-9>
- Li, T., Lu, Q., Wang, G., Xu, H., Huang, H., Cai, T., Kan, B., Ge, J., & Shao, F. (2013). SET-domain bacterial effectors target heterochromatin protein 1 to activate host rDNA transcription. *EMBO Reports*, *14*(8), 733-740. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.86>

- Li, T., Song, B., Wu, Z., Lu, M., & Zhu, W.-G. (2014). Systematic identification of Class I HDAC substrates. *Briefings in Bioinformatics*, *15*(6), 963-972. <https://doi.org/10.1093/bib/bbt060>
- Li, X. V., Leonardi, I., & Iliev, I. D. (2019). Gut mycobiota in immunity and inflammatory disease. *Immunity*, *50*(6), 1365-1379. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.023>
- Li, Y., & Seto, E. (2016). HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(10), a026831. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026831>
- Li, Y., Wen, H., Xi, Y., Tanaka, K., Wang, H., Peng, D., Ren, Y., Jin, Q., Dent, S. Y. R., Li, W., Li, H., & Shi, X. (2014). AF9 YEATS Domain Links Histone Acetylation to DOT1L-Mediated H3K79 Methylation. *Cell*, *159*(3), 558-571. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.049>
- Li Yim, A. Y. F., de Bruyn, J. R., Duijvis, N. W., Sharp, C., Ferrero, E., de Jonge, W. J., Wildenberg, M. E., Mannens, M. M. A. M., Buskens, C. J., D'Haens, G. R., Henneman, P., & te Velde, A. A. (2018). A distinct epigenetic profile distinguishes stenotic from non-inflamed fibroblasts in the ileal mucosa of Crohn's disease patients. *PLoS ONE*, *13*(12), e0209656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209656>
- Li Yim, A. Y. F., Duijvis, N. W., Ghiboub, M., Sharp, C., Ferrero, E., Mannens, M. M. A. M., D'Haens, G. R., de Jonge, W. J., te Velde, A. A., & Henneman, P. (2020). Whole-Genome DNA Methylation Profiling of CD14+ Monocytes Reveals Disease Status and Activity Differences in Crohn's Disease Patients. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(4), 1055. <https://doi.org/10.3390/jcm9041055>
- Li Yim, A. Y. F., Duijvis, N. W., Zhao, J., de Jonge, W. J., D'Haens, G. R. A. M., Mannens, M. M. A. M., Mul, A. N. P. M., te Velde, A. A., & Henneman, P. (2016). Peripheral blood methylation profiling of female Crohn's disease patients. *Clinical Epigenetics*, *8*(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0230-5>
- Liang, J., Zhu, H., Li, C., Ding, Y., Zhou, Z., & Wu, Q. (2012). Neonatal exposure to benzo[a]pyrene decreases the levels of serum testosterone and histone H3K14 acetylation of the StAR promoter in the testes of SD rats. *Toxicology*, *302*(2-3), 285-291. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.08.010>
- Lichtenstein, G. R., Loftus, E. V., Isaacs, K. L., Regueiro, M. D., Gerson, L. B., & Sands, B. E. (2018). ACG Clinical Guideline : Management of Crohn's Disease in Adults. *Official Journal of the American College of Gastroenterology | ACG*, *113*(4), 481-517. <https://doi.org/10.1038/ajg.2018.27>
- Liguori, G., Lamas, B., Richard, M. L., Brandi, G., da Costa, G., Hoffmann, T. W., Di Simone, M. P., Calabrese, C., Poggioli, G., Langella, P., Campieri, M., & Sokol, H. (2016). Fungal Dysbiosis in Mucosa-associated Microbiota of Crohn's Disease Patients. *Journal of Crohn's & Colitis*, *10*(3), 296-305. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv209>
- Lillico, R., Zhou, T., Khorshid Ahmad, T., Stesco, N., Gozda, K., Truong, J., Kong, J., Lakowski, T. M., & Namaka, M. (2018). Increased Post-Translational Lysine Acetylation of Myelin Basic Protein Is Associated with Peak Neurological Disability in a Mouse Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model of Multiple Sclerosis. *Journal of Proteome Research*, *17*(1), 55-62. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00270>
- Limon, J. J., Tang, J., Li, D., Wolf, A. J., Michelsen, K. S., Funari, V., Gargus, M., Nguyen, C., Sharma, P., Maymi, V. I., Iliev, I. D., Skalski, J. H., Brown, J., Landers, C., Borneman, J., Braun, J., Targan, S. R., McGovern, D. P. B., & Underhill, D. M. (2019). Malassezia is Associated with Crohn's Disease and Exacerbates Colitis in Mouse Models. *Cell host & microbe*, *25*(3), 377-388.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.007>
- Lin, K.-T., Wang, Y.-W., Chen, C.-T., Ho, C.-M., Su, W.-H., & Jou, Y.-S. (2012). HDAC inhibitors augmented cell migration and metastasis through induction of PKCs leading to identification of low toxicity modalities for combination cancer therapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *18*(17), 4691-4701. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0633>

- Lin, L., Jiang, H., Huang, M., Hou, X., Sun, X., Jiang, X., Dong, X., Sun, X., Zhou, B., & Qiao, H. (2015). Depletion of histone deacetylase 1 inhibits metastatic abilities of gastric cancer cells by regulating the miR-34a/CD44 pathway. *Oncology Reports*, *34*(2), 663-672. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4010>
- Lin, Z., Hegarty, J. P., Yu, W., Cappel, J. A., Chen, X., Faber, P. W., Wang, Y., Poritz, L. S., Fan, J.-B., & Koltun, W. A. (2012). Identification of disease-associated DNA methylation in B cells from Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Digestive Diseases and Sciences*, *57*(12), 3145-3153. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2288-z>
- Lippai, D., Bala, S., Catalano, D., Kodys, K., & Szabo, G. (2014). Micro-RNA-155 Deficiency Prevents Alcohol-Induced Serum Endotoxin Increase and Small Bowel Inflammation in Mice. *Alcoholism, clinical and experimental research*, *38*(8), 2217-2224. <https://doi.org/10.1111/acer.12483>
- Liu, D., Liu, Y., Qi, B., Gu, C., Huo, S., & Zhao, B. (2021). Trichostatin A promotes esophageal squamous cell carcinoma cell migration and EMT through BRD4/ERK1/2-dependent pathway. *Cancer Medicine*, *10*(15), 5235-5245. <https://doi.org/10.1002/cam4.4059>
- Liu, J. Z., Jellbauer, S., Poe, A., Ton, V., Pesciaroli, M., Kehl-Fie, T., Restrepo, N. A., Hosking, M., Edwards, R. A., Battistoni, A., Pasquali, P., Lane, T. E., Chazin, W. J., Vogl, T., Roth, J., Skaar, E. P., & Raffatellu, M. (2012). Zinc sequestration by the neutrophil protein calprotectin enhances Salmonella growth in the inflamed gut. *Cell host & microbe*, *11*(3), 227-239. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.01.017>
- Liu, J. Z., van Sommeren, S., Huang, H., Ng, S. C., Alberts, R., Takahashi, A., Ripke, S., Lee, J. C., Jostins, L., Shah, T., Abedian, S., Cheon, J. H., Cho, J., Dayani, N. E., Franke, L., Fuyuno, Y., Hart, A., Juyal, R. C., Juyal, G., ... Weersma, R. K. (2015). Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nature Genetics*, *47*(9), 979-986. <https://doi.org/10.1038/ng.3359>
- Liu, T., Wang, R., Xu, H., Song, Y., & Qi, Y. (2017). A Highly Potent and Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitor Prevents DSS-Induced Colitis in Mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *40*(6), 936-940. <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-01023>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *2*, 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Liu, T.-C., Kern, J. T., Jain, U., Sonnek, N. M., Xiong, S., Simpson, K. F., VanDussen, K. L., Winkler, E. S., Haritunians, T., Malique, A., Lu, Q., Sasaki, Y., Storer, C., Diamond, M. S., Head, R. D., McGovern, D. P. B., & Stappenbeck, T. S. (2021). Western diet induces Paneth cell defects through microbiome alterations and farnesoid X receptor and type I interferon activation. *Cell Host & Microbe*, *29*(6), 988-1001.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.04.004>
- Liu, T.-C., Kern, J. T., VanDussen, K. L., Xiong, S., Kaiko, G. E., Wilen, C. B., Rajala, M. W., Caruso, R., Holtzman, M. J., Gao, F., McGovern, D. P., Nunez, G., Head, R. D., & Stappenbeck, T. S. (2018). Interaction between smoking and ATG16L1T300A triggers Paneth cell defects in Crohn's disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *128*(11), 5110-5122. <https://doi.org/10.1172/JCI120453>
- Liu, Y., Chen, S., Pang, D., Zhou, J., Xu, X., Yang, S., Huang, Z., & Yu, B. (2022). Effects of paternal exposure to cigarette smoke on sperm DNA methylation and long-term metabolic syndrome in offspring. *Epigenetics & Chromatin*, *15*(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s13072-022-00437-8>
- Lo, C.-H., Lochhead, P., Khalili, H., Song, M., Tabung, F. K., Burke, K. E., Richter, J. M., Giovannucci, E. L., Chan, A. T., & Ananthakrishnan, A. N. (2020). Dietary Inflammatory Potential and Risk of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*, *159*(3), 873-883.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.05.011>
- Long, S. L., Gahan, C. G. M., & Joyce, S. A. (2017). Interactions between gut bacteria and bile in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, *56*, 54-65. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.06.002>
- Lopez-Siles, M., Martinez-Medina, M., Busquets, D., Sabat-Mir, M., Duncan, S. H., Flint, H. J., Aldeguer, X., & Garcia-Gil, L. J. (2014). Mucosa-associated Faecalibacterium prausnitzii and Escherichia coli co-abundance can distinguish

- Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease phenotypes. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(3), 464-475. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.02.009>
- Low, D., Tran, H. T., Lee, I.-A., Dreux, N., Kamba, A., Reinecker, H.-C., Darfeuille-Michaud, A., Barnich, N., & Mizoguchi, E. (2013). Chitin-Binding Domains of *Escherichia coli* chiA Mediate Interactions With Intestinal Epithelial Cells in Mice with Colitis. *Gastroenterology*, 145(3), 602-612.e9. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.05.017>
- Lu, C., Chen, J., Xu, H.-G., Zhou, X., He, Q., Li, Y.-L., Jiang, G., Shan, Y., Xue, B., Zhao, R.-X., Wang, Y., Werle, K. D., Cui, R., Liang, J., & Xu, Z.-X. (2014). MIR106B and MIR93 Prevent Removal of Bacteria from Epithelial Cells by Disrupting ATG16L1-Mediated Autophagy. *Gastroenterology*, 146(1), 10.1053/j.gastro.2013.09.006. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.09.006>
- Lu, Y., Fan, C., Liang, A., Fan, X., Wang, R., Li, P., & Qi, K. (2018). Effects of SCFA on the DNA methylation pattern of adiponectin and resistin in high-fat-diet-induced obese male mice. *British Journal of Nutrition*, 120(4), 385-392. <https://doi.org/10.1017/S0007114518001526>
- Lu, Y., Li, C.-Y., Lin, S.-S., & Yuan, P. (2014). IRGM rs13361189 polymorphism may contribute to susceptibility to Crohn's disease: A meta-analysis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 8(2), 607-613. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1736>
- Lu, Z.-J., Wu, J.-J., Jiang, W.-L., Xiao, J.-H., Tao, K.-Z., Ma, L., Zheng, P., Wan, R., & Wang, X.-P. (2017). MicroRNA-155 promotes the pathogenesis of experimental colitis by repressing SHIP-1 expression. *World Journal of Gastroenterology*, 23(6), 976-985. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i6.976>
- Luo, J., Su, F., Chen, D., Shiloh, A., & Gu, W. (2000). Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature*, 408(6810), 377-381. <https://doi.org/10.1038/35042612>
- Ma, T. Y., Boivin, M. A., Ye, D., Pedram, A., & Said, H. M. (2005). Mechanism of TNF- $\alpha$  modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: Role of myosin light-chain kinase protein expression. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288(3), G422-430. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00412.2004>
- Ma, Y., Xia, W., Wang, D. Q., Wan, Y. J., Xu, B., Chen, X., Li, Y. Y., & Xu, S. Q. (2013). Hepatic DNA methylation modifications in early development of rats resulting from perinatal BPA exposure contribute to insulin resistance in adulthood. *Diabetologia*, 56(9), 2059-2067. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2944-7>
- Madanchi, M., Fagagnini, S., Fournier, N., Biedermann, L., Zeitz, J., Battegay, E., Zimmerli, L., Vavricka, S. R., Rogler, G., Scharl, M., & Swiss IBD Cohort Study Group. (2018). The Relevance of Vitamin and Iron Deficiency in Patients with Inflammatory Bowel Diseases in Patients of the Swiss IBD Cohort. *Inflammatory Bowel Diseases*, 24(8), 1768-1779. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy054>
- Maeda, M., Moro, H., & Ushijima, T. (2017). Mechanisms for the induction of gastric cancer by *Helicobacter pylori* infection: Aberrant DNA methylation pathway. *Gastric Cancer*, 20(1), 8-15. <https://doi.org/10.1007/s10120-016-0650-0>
- Maeda, S., Hsu, L.-C., Liu, H., Bankston, L. A., Iimura, M., Kagnoff, M. F., Eckmann, L., & Karin, M. (2005). Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5710), 734-738. <https://doi.org/10.1126/science.1103685>
- Maekita, T., Nakazawa, K., Mihara, M., Nakajima, T., Yanaoka, K., Iguchi, M., Arii, K., Kaneda, A., Tsukamoto, T., Tatematsu, M., Tamura, G., Saito, D., Sugimura, T., Ichinose, M., & Ushijima, T. (2006). High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(3 Pt 1), 989-995. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2096>



- Mahajan, A., Sapehia, D., Thakur, S., Mohanraj, P. S., Bagga, R., & Kaur, J. (2019). Effect of imbalance in folate and vitamin B12 in maternal/parental diet on global methylation and regulatory miRNAs. *Scientific Reports*, *9*(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54070-9>
- Mahid, S. S., Minor, K. S., Soto, R. E., Hornung, C. A., & Galandiuk, S. (2006). Smoking and inflammatory bowel disease : A meta-analysis. *Mayo Clinic Proceedings*, *81*(11), 1462-1471. <https://doi.org/10.4065/81.11.1462>
- Mahmoud, A. M., & Ali, M. M. (2019). Methyl Donor Micronutrients that Modify DNA Methylation and Cancer Outcome. *Nutrients*, *11*(3), 608. <https://doi.org/10.3390/nu11030608>
- Mahmoudi, E., Mozhgani, S.-H., & Sharifinejad, N. (2021). The role of mycobiota-genotype association in inflammatory bowel diseases : A narrative review. *Gut Pathogens*, *13*(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13099-021-00426-4>
- Maillard, F., Vazeille, E., Sauvanet, P., Sirvent, P., Bonnet, R., Combaret, L., Chausse, P., Chevarin, C., Otero, Y. F., Delcros, G., Chavanelle, V., Boisseau, N., & Barnich, N. (2019). Preventive Effect of Spontaneous Physical Activity on the Gut-Adipose Tissue in a Mouse Model That Mimics Crohn's Disease Susceptibility. *Cells*, *8*(1), 33. <https://doi.org/10.3390/cells8010033>
- Malesza, I. J., Malesza, M., Walkowiak, J., Mussin, N., Walkowiak, D., Aringazina, R., Bartkowiak-Wieczorek, J., & Mądry, E. (2021). High-Fat, Western-Style Diet, Systemic Inflammation, and Gut Microbiota : A Narrative Review. *Cells*, *10*(11), 3164. <https://doi.org/10.3390/cells10113164>
- Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., Roca, J., & Dore, J. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, *55*(2), 205-211. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.073817>
- Mao, R., Kurada, S., Gordon, I. O., Baker, M. E., Gandhi, N., McDonald, C., Coffey, J. C., & Rieder, F. (2019). The Mesenteric Fat and Intestinal Muscle Interface : Creeping Fat Influencing Stricture Formation in Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *25*(3), 421-426. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy331>
- Mao, W., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2015). A dietary phytochemical alters caste-associated gene expression in honey bees. *Science Advances*, *1*(7), e1500795. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500795>
- Marmorstein, R., & Zhou, M.-M. (2014). Writers and Readers of Histone Acetylation : Structure, Mechanism, and Inhibition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(7), a018762. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018762>
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M., González-Huix, F., López-Oliu, C., Dahbi, G., Blanco, J. E., Blanco, J., Garcia-Gil, L. J., & Darfeuille-Michaud, A. (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), 872-882. <https://doi.org/10.1002/ibd.20860>
- Martinez-Medina, M., Denizot, J., Dreux, N., Robin, F., Billard, E., Bonnet, R., Darfeuille-Michaud, A., & Barnich, N. (2014). Western diet induces dysbiosis with increased *E coli* in CEABAC10 mice , alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut*, *63*(1), 116-124. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-304119>
- Martin-Gallausiaux, C., Béguet-Crespel, F., Marinelli, L., Jamet, A., Ledue, F., Blottière, H. M., & Lapaque, N. (2018). Butyrate produced by gut commensal bacteria activates TGF-beta1 expression through the transcription factor SP1 in human intestinal epithelial cells. *Scientific Reports*, *8*(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28048-y>
- Mathias, R. A., Guise, A. J., & Cristea, I. M. (2015). Post-translational Modifications Regulate Class IIA Histone Deacetylase (HDAC) Function in Health and Disease. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, *14*(3), 456-470. <https://doi.org/10.1074/mcp.O114.046565>
- Matsumoto, S., Okabe, Y., Setoyama, H., Takayama, K., Ohtsuka, J., Funahashi, H., Imaoka, A., Okada, Y., & Umesaki, Y. (1998). Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. *Gut*, *43*(1), 71-78. <https://doi.org/10.1136/gut.43.1.71>



- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Horinouchi, S., & Yoshida, M. (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *The EMBO Journal*, *21*(24), 6820-6831. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf682>
- Mazur-Bialy, A. I., Bilski, J., Wojcik, D., Brzozowski, B., Surmiak, M., Hubalewska-Mazgaj, M., Chmura, A., Magierowski, M., Magierowska, K., Mach, T., & Brzozowski, T. (2017). Beneficial Effect of Voluntary Exercise on Experimental Colitis in Mice Fed a High-Fat Diet : The Role of Irisin, Adiponectin and Proinflammatory Biomarkers. *Nutrients*, *9*(4), 410. <https://doi.org/10.3390/nu9040410>
- McCarroll, S. A., Huett, A., Kuballa, P., Chilewski, S. D., Landry, A., Goyette, P., Zody, M. C., Hall, J. L., Brant, S. R., Cho, J. H., Duerr, R. H., Silverberg, M. S., Taylor, K. D., Rioux, J. D., Altshuler, D., Daly, M. J., & Xavier, R. J. (2008). Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nature Genetics*, *40*(9), 1107-1112. <https://doi.org/10.1038/ng.215>
- McCartney, D. L., Stevenson, A. J., Hillary, R. F., Walker, R. M., Bermingham, M. L., Morris, S. W., Clarke, T.-K., Campbell, A., Murray, A. D., Whalley, H. C., Porteous, D. J., Visscher, P. M., McIntosh, A. M., Evans, K. L., Deary, I. J., & Marioni, R. E. (2018). Epigenetic signatures of starting and stopping smoking. *EBioMedicine*, *37*, 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.10.051>
- McKenzie, H., Main, J., Pennington, C. R., & Parratt, D. (1990). Antibody to selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's and brewer's yeast) and *Candida albicans* in Crohn's disease. *Gut*, *31*(5), 536-538. <https://doi.org/10.1136/gut.31.5.536>
- McPhee, J. B., Small, C. L., Reid-Yu, S. A., Brannon, J. R., Le Moual, H., & Coombes, B. K. (2014). Host defense peptide resistance contributes to colonization and maximal intestinal pathology by Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, *82*(8), 3383-3393. <https://doi.org/10.1128/IAI.01888-14>
- Mehta, S., Cronkite, D. A., Basavappa, M., Saunders, T. L., Adiliaghdam, F., Amatullah, H., Morrison, S. A., Pagan, J. D., Anthony, R. M., Tonnerre, P., Lauer, G. M., Lee, J. C., Digumarthi, S., Pantano, L., Ho Sui, S. J., Ji, F., Sadreyev, R., Zhou, C., Mullen, A. C., ... Jeffrey, K. L. (2017). Maintenance of macrophage transcriptional programs and intestinal homeostasis by epigenetic reader SP140. *Science Immunology*, *2*(9), eaag3160. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aag3160>
- Mehto, S., Jena, K. K., Nath, P., Chauhan, S., Kolapalli, S. P., Das, S. K., Sahoo, P. K., Jain, A., Taylor, G. A., & Chauhan, S. (2019). The Crohn's Disease Risk Factor IRGM Limits NLRP3 Inflammasome Activation by Impeding Its Assembly and by Mediating Its Selective Autophagy. *Molecular Cell*, *73*(3), 429-445.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.018>
- Meijer, B. M., Jang, S. M., Guerrero, I. C., Chhuon, C., Lipecka, J., Reisacher, C., Baleux, F., Sansonetti, P. J., Muchardt, C., & Arbibe, L. (2017). Threonine eliminylation by bacterial phosphothreonine lyases rapidly causes cross-linking of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in live cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *292*(19), 7784-7794. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.775940>
- Meinzer, U., Barreau, F., Esmiol-Welterlin, S., Jung, C., Villard, C., Léger, T., Ben-Mkaddem, S., Berrebi, D., Dussaillant, M., Alnabhani, Z., Roy, M., Bonacorsi, S., Wolf-Watz, H., Perroy, J., Ollendorff, V., & Hugot, J.-P. (2012). Yersinia pseudotuberculosis effector YopJ subverts the Nod2/RICK/TAK1 pathway and activates caspase-1 to induce intestinal barrier dysfunction. *Cell Host & Microbe*, *11*(4), 337-351. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.02.009>
- Meinzer, U., Esmiol-Welterlin, S., Barreau, F., Berrebi, D., Dussaillant, M., Bonacorsi, S., Chareyre, F., Niwa-Kawakita, M., Alberti, C., Sterkers, G., Villard, C., Lesuffleur, T., Peuchmaur, M., Karin, M., Eckmann, L., Giovannini, M., Ollendorff, V., Wolf-Watz, H., & Hugot, J.-P. (2008). Nod2 mediates susceptibility to Yersinia pseudotuberculosis in mice. *PloS One*, *3*(7), e2769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002769>
- Mercken, E. M., Majounie, E., Ding, J., Guo, R., Kim, J., Bernier, M., Mattison, J., Cookson, M. R., Gorospe, M., de Cabo, R., & Abdelmohsen, K. (2013). Age-associated miRNA Alterations in Skeletal Muscle from Rhesus Monkeys reversed by caloric restriction. *Aging (Albany NY)*, *5*(9), 692-703.

- Middel, P., Raddatz, D., Gunawan, B., Haller, F., & Radzun, H.-J. (2006). Increased number of mature dendritic cells in Crohn's disease: Evidence for a chemokine mediated retention mechanism. *Gut*, *55*(2), 220-227. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.063008>
- Millard, C. J., Watson, P. J., Celardo, I., Gordiyenko, Y., Cowley, S. M., Robinson, C. V., Fairall, L., & Schwabe, J. W. R. (2013). Class I HDACs Share a Common Mechanism of Regulation by Inositol Phosphates. *Molecular Cell*, *51*(1), 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.05.020>
- Miller, K. M., Tjeertes, J. V., Coates, J., Legube, G., Polo, S. E., Britton, S., & Jackson, S. P. (2010). Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA non-homologous end-joining. *Nature structural & molecular biology*, *17*(9), 1144-1151. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1899>
- Minamiya, Y., Ono, T., Saito, H., Takahashi, N., Ito, M., Mitsui, M., Motoyama, S., & Ogawa, J. (2011). Expression of histone deacetylase 1 correlates with a poor prognosis in patients with adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, *74*(2), 300-304. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.02.019>
- Minekus, M. (2015). The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM). In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, & H. Wichers (Éds.), *The Impact of Food Bioactives on Health : In vitro and ex vivo models*. Springer. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500162/>
- Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R., & Veld, J. H. J. H. in't. (1995). A Multicompartmental Dynamic Computer-controlled Model Simulating the Stomach and Small Intestine. *Alternatives to Laboratory Animals*, *23*(2), 197-209. <https://doi.org/10.1177/026119299502300205>
- Minot, S., Bryson, A., Chehoud, C., Wu, G. D., Lewis, J. D., & Bushman, F. D. (2013). Rapid evolution of the human gut virome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(30), 12450-12455. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300833110>
- Misztak, P., Pańczyszyn-Trzewik, P., & Sowa-Kućma, M. (2018). Histone deacetylases (HDACs) as therapeutic target for depressive disorders. *Pharmacological Reports*, *70*(2), 398-408. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.08.001>
- Mithraprabhu, S., Kalff, A., Chow, A., Khong, T., & Spencer, A. (2014). Dysregulated Class I histone deacetylases are indicators of poor prognosis in multiple myeloma. *Epigenetics*, *9*(11), 1511-1520. <https://doi.org/10.4161/15592294.2014.983367>
- Mitsuyama, K., Niwa, M., Takedatsu, H., Yamasaki, H., Kuwaki, K., Yoshioka, S., Yamauchi, R., Fukunaga, S., & Torimura, T. (2016). Antibody markers in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, *22*(3), 1304-1310. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i3.1304>
- Mizoguchi, E. (2006). Chitinase 3-like-1 exacerbates intestinal inflammation by enhancing bacterial adhesion and invasion in colonic epithelial cells. *Gastroenterology*, *130*(2), 398-411. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.12.007>
- Moller, F. T., Andersen, V., Wohlfahrt, J., & Jess, T. (2015). Familial Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Cohort Study 1977-2011. *American Journal of Gastroenterology*, *110*(4), 564-571. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.50>
- Mondot, S., Barreau, F., Al Nabhani, Z., Dussailant, M., Le Roux, K., Doré, J., Leclerc, M., Hugot, J.-P., & Lepage, P. (2012). Altered gut microbiota composition in immune-impaired Nod2(-/-) mice. *Gut*, *61*(4), 634-635. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300478>
- Moon, C. M., Shin, D.-J., Kim, S. W., Son, N.-H., Park, A., Park, B., Jung, E. S., Kim, E. S., Hong, S. P., Kim, T. I., Kim, W. H., & Cheon, J. H. (2013). Associations between genetic variants in the IRGM gene and inflammatory bowel diseases in the Korean population. *Inflammatory Bowel Diseases*, *19*(1), 106-114. <https://doi.org/10.1002/ibd.22972>
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, *38*(1), 1. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>

- Moores, R. C., Brilha, S., Schutgens, F., Elkington, P. T., & Friedland, J. S. (2017). Epigenetic Regulation of Matrix Metalloproteinase-1 and -3 Expression in Mycobacterium tuberculosis Infection. *Frontiers in Immunology*, 8, 602. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00602>
- Mörbe, U. M., Jørgensen, P. B., Fenton, T. M., von Burg, N., Riis, L. B., Spencer, J., & Agace, W. W. (2021). Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunology*, 14(4), 4. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00389-4>
- Moret-Tatay, I., Cerrillo, E., Sáez-González, E., Hervás, D., Iborra, M., Sandoval, J., Busó, E., Tortosa, L., Nos, P., & Beltrán, B. (2019). Identification of Epigenetic Methylation Signatures With Clinical Value in Crohn's Disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 10(10), e00083. <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000083>
- Morgan, X. C., Tickle, T. L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K. L., Ward, D. V., Reyes, J. A., Shah, S. A., LeLeiko, N., Snapper, S. B., Bousvaros, A., Korzenik, J., Sands, B. E., Xavier, R. J., & Huttenhower, C. (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biology*, 13(9), R79. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-9-r79>
- Morosi, L. G., Cutine, A. M., Cagnoni, A. J., Manselle-Cocco, M. N., Croci, D. O., Merlo, J. P., Morales, R. M., May, M., Pérez-Sáez, J. M., Girotti, M. R., Méndez-Huergo, S. P., Pucci, B., Gil, A. H., Huernos, S. P., Docena, G. H., Sambuelli, A. M., Toscano, M. A., Rabinovich, G. A., & Mariño, K. V. (2021). Control of intestinal inflammation by glycosylation-dependent lectin-driven immunoregulatory circuits. *Science Advances*, 7(25), eabf8630. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf8630>
- Morrison, O., & Thakur, J. (2021). Molecular Complexes at Euchromatin, Heterochromatin and Centromeric Chromatin. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6922. <https://doi.org/10.3390/ijms22136922>
- Morselli, M., Pastor, W. A., Montanini, B., Nee, K., Ferrari, R., Fu, K., Bonora, G., Rubbi, L., Clark, A. T., Ottonello, S., Jacobsen, S. E., & Pellegrini, M. (2015). In vivo targeting of de novo DNA methylation by histone modifications in yeast and mouse. *ELife*, 4, e06205. <https://doi.org/10.7554/eLife.06205>
- Mosli, M. H., Zou, G., Garg, S. K., Feagan, S. G., MacDonald, J. K., Chande, N., Sandborn, W. J., & Feagan, B. G. (2015). C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin, and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Gastroenterology*, 110(6), 802-819. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.120>
- Mowat, C., Cole, A., Windsor, A., Ahmad, T., Arnott, I., Driscoll, R., Mitton, S., Orchard, T., Rutter, M., Younge, L., Lees, C., Ho, G.-T., Satsangi, J., Bloom, S., & IBD Section of the British Society of Gastroenterology. (2011). Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*, 60(5), 571-607. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.224154>
- Muhammad, J. S., Eladl, M. A., & Khoder, G. (2019). Helicobacter pylori-induced DNA Methylation as an Epigenetic Modulator of Gastric Cancer: Recent Outcomes and Future Direction. *Pathogens*, 8(1), 23. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010023>
- Mukherjee, S., Dasgupta, S., Mishra, P. K., & Chaudhury, K. (2021). Air pollution-induced epigenetic changes: Disease development and a possible link with hypersensitivity pneumonitis. *Environmental Science and Pollution Research International*, 28(40), 55981-56002. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16056-x>
- Mukhopadhyay, I., Hansen, R., Meharg, C., Thomson, J. M., Russell, R. K., Berry, S. H., El-Omar, E. M., & Hold, G. L. (2015). The fungal microbiota of de-novo paediatric inflammatory bowel disease. *Microbes and Infection*, 17(4), 304-310. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.12.001>
- Multhaup, M. L., Seldin, M., Jaffe, A. E., Lei, X., Kirchner, H., Mondal, P., Li, Y., Rodriguez, V., Drong, A., Hussain, M., Lindgren, C., McCarthy, M., Näslund, E., Zierath, J. R., Wong, G. W., & Feinberg, A. P. (2015). Mouse-human experimental epigenetic analysis unmasks dietary targets and genetic liability for diabetic phenotypes. *Cell metabolism*, 21(1), 138-149. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.014>

- Murphy, P. J. M., Morishima, Y., Kovacs, J. J., Yao, T.-P., & Pratt, W. B. (2005). Regulation of the dynamics of hsp90 action on the glucocorticoid receptor by acetylation/deacetylation of the chaperone. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33792-33799. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506997200>
- Murthy, A., Li, Y., Peng, I., Reichelt, M., Katakam, A. K., Noubade, R., Roose-Girma, M., DeVoss, J., Diehl, L., Graham, R. R., & van Lookeren Campagne, M. (2014). A Crohn's disease variant in Atg1611 enhances its degradation by caspase 3. *Nature*, 506(7489), 456-462. <https://doi.org/10.1038/nature13044>
- Nadaljian, B., Yadegar, A., Hourii, H., Olfatifar, M., Shahrokh, S., Asadzadeh Aghdaei, H., Suzuki, H., & Zali, M. R. (2021). Prevalence of the pathobiont adherent-invasive *ESCHERICHIA COLI* and inflammatory bowel disease : A systematic review and meta-analysis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 36(4), 852-863. <https://doi.org/10.1111/jgh.15260>
- Naddei, R., Martinelli, M., Strisciuglio, C., D'Armiento, M., Vollaro, A., Staiano, A., & Miele, E. (2017). Yersinia Enterocolitica Ileitis Mimicking Pediatric Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 23(4), E15-E16. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000001052>
- Nadeau, K., McDonald-Hyman, C., Noth, E. M., Pratt, B., Hammond, S. K., Balmes, J., & Tager, I. (2010). Ambient air pollution impairs regulatory T-cell function in asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(4), 845-852.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.08.008>
- Nag, D., Farr, D., Raychaudhuri, S., & Withey, J. H. (2022). An adult zebrafish model for adherent-invasive Escherichia coli indicates protection from AIEC infection by probiotic E. coli Nissle. *iScience*, 25(7), 104572. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104572>
- Nagao-Kitamoto, H., Shreiner, A. B., Gilliland, M. G., Kitamoto, S., Ishii, C., Hirayama, A., Kuffa, P., El-Zaatari, M., Grasberger, H., Seekatz, A. M., Higgins, P. D. R., Young, V. B., Fukuda, S., Kao, J. Y., & Kamada, N. (2016). Functional Characterization of Inflammatory Bowel Disease-Associated Gut Dysbiosis in Gnotobiotic Mice. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2(4), 468-481. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.02.003>
- Naimi, S., Viennois, E., Gewirtz, A. T., & Chassaing, B. (2021). Direct impact of commonly used dietary emulsifiers on human gut microbiota. *Microbiome*, 9(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00996-6>
- Nakata, K., Sugi, Y., Narabayashi, H., Kobayakawa, T., Nakanishi, Y., Tsuda, M., Hosono, A., Kaminogawa, S., Hanazawa, S., & Takahashi, K. (2017). Commensal microbiota-induced microRNA modulates intestinal epithelial permeability through the small GTPase ARF4. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(37), 15426-15433. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.788596>
- Narula, N., Wong, E. C. L., Dehghan, M., Mente, A., Rangarajan, S., Lanas, F., Lopez-Jaramillo, P., Rohatgi, P., Lakshmi, P. V. M., Varma, R. P., Orlandini, A., Avezum, A., Wielgosz, A., Poirier, P., Almadi, M. A., Altuntas, Y., Ng, K. K., Chifamba, J., Yeates, K., ... Yusuf, S. (2021). Association of ultra-processed food intake with risk of inflammatory bowel disease : Prospective cohort study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 374, n1554. <https://doi.org/10.1136/bmj.n1554>
- Naser, S. A., Ghobrial, G., Romero, C., & Valentine, J. F. (2004). Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet (London, England)*, 364(9439), 1039-1044. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17058-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17058-X)
- Naser, S. A., Sagramsingh, S. R., Naser, A. S., & Thanigachalam, S. (2014). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis causes Crohn's disease in some inflammatory bowel disease patients. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(23), 7403-7415. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7403>
- Navabi, N., Whitt, J., Wu, S., Woo, V., Moncivaiz, J., Jordan, M. B., Vallance, B. A., Way, S. S., & Alenghat, T. (2017). Epithelial Histone Deacetylase 3 Instructs Intestinal Immunity by Coordinating Local Lymphocyte Activation. *Cell Reports*, 19(6), 1165-1175. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.046>



- Nazareth, N., Magro, F., Machado, E., Ribeiro, T. G., Martinho, A., Rodrigues, P., Alves, R., Macedo, G. N., Gracio, D., Coelho, R., Abreu, C., Appelberg, R., Dias, C., Macedo, G., Bull, T., & Sarmento, A. (2015). Prevalence of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis and Escherichia coli in blood samples from patients with inflammatory bowel disease. *Medical Microbiology and Immunology*, 204(6), 681-692. <https://doi.org/10.1007/s00430-015-0420-3>
- Necchi, V., Ricci, V., Sommi, P., & Solcia, E. (2019). CagA Effector Protein in Helicobacter pylori-Infected Human Gastric Epithelium in Vivo : From Bacterial Core and Adhesion/Injection Clusters to Host Cell Proteasome-Rich Cytosol. *Toxins*, 11(11), 618. <https://doi.org/10.3390/toxins11110618>
- Negroni, A., Colantoni, E., Vitali, R., Palone, F., Pierdomenico, M., Costanzo, M., Cesi, V., Cucchiara, S., & Stronati, L. (2016). NOD2 induces autophagy to control AIEC bacteria infectiveness in intestinal epithelial cells. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 65(10), 803-813. <https://doi.org/10.1007/s00011-016-0964-8>
- Nelson, A., Stewart, C. J., Kennedy, N. A., Lodge, J. K., Tremelling, M., UK IBD Genetics Consortium, Probert, C. S., Parkes, M., Mansfield, J. C., Smith, D. L., Hold, G. L., Lees, C. W., Bridge, S. H., & Lamb, C. A. (2021). The Impact of NOD2 Genetic Variants on the Gut Mycobiota in Crohn's Disease Patients in Remission and in Individuals Without Gastrointestinal Inflammation. *Journal of Crohn's & Colitis*, 15(5), 800-812. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjaa220>
- Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., & Kaplan, G. G. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century : A systematic review of population-based studies. *The Lancet*, 390(10114), 2769-2778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0)
- Nguyen, H. T. T., Dalmaso, G., Müller, S., Carrière, J., Seibold, F., & Darfeuille-Michaud, A. (2014). Crohn's disease-associated adherent invasive Escherichia coli modulate levels of microRNAs in intestinal epithelial cells to reduce autophagy. *Gastroenterology*, 146(2), 508-519. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.021>
- Nickerson, K. P., Chanin, R., & McDonald, C. (2015). Deregulation of intestinal anti-microbial defense by the dietary additive, maltodextrin. *Gut Microbes*, 6(1), 78-83. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1005477>
- Nickerson, K. P., & McDonald, C. (2012). Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli adhesion is enhanced by exposure to the ubiquitous dietary polysaccharide maltodextrin. *PLoS One*, 7(12), e52132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052132>
- Nie, L., Shuai, L., Zhu, M., Liu, P., Xie, Z.-F., Jiang, S., Jiang, H.-W., Li, J., Zhao, Y., Li, J.-Y., & Tan, M. (2017). The Landscape of Histone Modifications in a High-Fat Diet-Induced Obese (DIO) Mouse Model. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 16(7), 1324-1334. <https://doi.org/10.1074/mcp.M117.067553>
- Nijhawan, P., Behl, T., Khullar, G., Pal, G., Kandhwal, M., & Goyal, A. (2020). HDAC in obesity : A critical insight. *Obesity Medicine*, 18, 100212. <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2020.100212>
- Nimmo, E. R., Prendergast, J. G., Aldhous, M. C., Kennedy, N. A., Henderson, P., Drummond, H. E., Ramsahoye, B. H., Wilson, D. C., Semple, C. A., & Satsangi, J. (2012). Genome-wide methylation profiling in Crohn's disease identifies altered epigenetic regulation of key host defense mechanisms including the Th17 pathway. *Inflammatory Bowel Diseases*, 18(5), 889-899. <https://doi.org/10.1002/ibd.21912>
- Nishida, A., Inoue, R., Inatomi, O., Bamba, S., Naito, Y., & Andoh, A. (2018). Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical Journal of Gastroenterology*, 11(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s12328-017-0813-5>
- Nitzan, O., Elias, M., Peretz, A., & Saliba, W. (2016). Role of antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 22(3), 1078-1087. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i3.1078>



- Niwa, T., Toyoda, T., Tsukamoto, T., Mori, A., Tatematsu, M., & Ushijima, T. (2013). Prevention of Helicobacter pylori-induced gastric cancers in gerbils by a DNA demethylating agent. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, *6*(4), 263-270. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-12-0369>
- Niwa, T., Tsukamoto, T., Toyoda, T., Mori, A., Tanaka, H., Maekita, T., Ichinose, M., Tatematsu, M., & Ushijima, T. (2010). Inflammatory processes triggered by Helicobacter pylori infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Research*, *70*(4), 1430-1440. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2755>
- Norman, J. M., Handley, S. A., Baldridge, M. T., Droit, L., Liu, C. Y., Keller, B. C., Kambal, A., Monaco, C. L., Zhao, G., Fleshner, P., Stappenbeck, T. S., McGovern, D. P. B., Keshavarzian, A., Mutlu, E. A., Sauk, J., Gevers, D., Xavier, R. J., Wang, D., Parkes, M., & Virgin, H. W. (2015). Disease-specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease. *Cell*, *160*(3), 447-460. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.002>
- Nunes, T., Etchevers, M. J., Domènech, E., García-Sánchez, V., Ber, Y., Peñalva, M., Merino, O., Nos, P., Garcia-Planella, E., Casbas, A. G., Esteve, M., Taxonera Samsó, C., Montoro Hugueta, M., Gisbert, J. P., Martín Arranz, M. D., García-Sepulcre, M. F., Barreiro-de Acosta, M., Beltrán, B., Alcaide Suárez, N., ... Tobacco-Eneida Study Group of GETECCU. (2013). Smoking does influence disease behaviour and impacts the need for therapy in Crohn's disease in the biologic era. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *38*(7), 752-760. <https://doi.org/10.1111/apt.12440>
- O'Brien, C. L., Bringer, M.-A., Holt, K. E., Gordon, D. M., Dubois, A. L., Barnich, N., Darfeuille-Michaud, A., & Pavli, P. (2017). Comparative genomics of Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli. *Gut*, *66*(8), 1382-1389. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-311059>
- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., & Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, *87*(5), 953-959. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)82001-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)82001-2)
- Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nuñez, G., & Cho, J. H. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, *411*(6837), 603-606. <https://doi.org/10.1038/35079114>
- Olén, O., Erichsen, R., Sachs, M. C., Pedersen, L., Halfvarson, J., Askling, J., Ekblom, A., Sørensen, H. T., & Ludvigsson, J. F. (2020). Colorectal cancer in Crohn's disease: A Scandinavian population-based cohort study. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, *5*(5), 475-484. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30005-4](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30005-4)
- O'Reilly, S. L., McGlynn, A. P., McNulty, H., Reynolds, J., Wasson, G. R., Molloy, A. M., Strain, J. J., Weir, D. G., Ward, M., McKerr, G., Scott, J. M., & Downes, C. S. (2016). Folic Acid Supplementation in Postpolypectomy Patients in a Randomized Controlled Trial Increases Tissue Folate Concentrations and Reduces Aberrant DNA Biomarkers in Colonic Tissues Adjacent to the Former Polyp Site. *The Journal of Nutrition*, *146*(5), 933-939. <https://doi.org/10.3945/jn.115.222547>
- Orholm, M., Binder, V., Sørensen, T. I., Rasmussen, L. P., & Kyvik, K. O. (2000). Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *35*(10), 1075-1081. <https://doi.org/10.1080/003655200451207>
- Ormsby, M. J., Logan, M., Johnson, S. A., McIntosh, A., Fallata, G., Papadopoulou, R., Papachristou, E., Hold, G. L., Hansen, R., Ijaz, U. Z., Russell, R. K., Gerasimidis, K., & Wall, D. M. (2019). Inflammation associated ethanolamine facilitates infection by Crohn's disease-linked adherent-invasive Escherichia coli. *EBioMedicine*, *43*, 325-332. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.071>
- Osada, H., Tatematsu, Y., Saito, H., Yatabe, Y., Mitsudomi, T., & Takahashi, T. (2004). Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients. *International Journal of Cancer*, *112*(1), 26-32. <https://doi.org/10.1002/ijc.20395>
- Oshima, T., Laroux, F. S., Coe, L. L., Morise, Z., Kawachi, S., Bauer, P., Grisham, M. B., Specian, R. D., Carter, P., Jennings, S., Granger, D. N., Joh, T., & Alexander, J. S. (2001). Interferon-gamma and interleukin-10 reciprocally

- regulate endothelial junction integrity and barrier function. *Microvascular Research*, 61(1), 130-143. <https://doi.org/10.1006/mvre.2000.2288>
- Pacis, A., Tailleux, L., Morin, A. M., Lambourne, J., MacIsaac, J. L., Yotova, V., Dumaine, A., Danckaert, A., Luca, F., Grenier, J.-C., Hansen, K. D., Gicquel, B., Yu, M., Pai, A., He, C., Tung, J., Pastinen, T., Kobor, M. S., Pique-Regi, R., ... Barreiro, L. B. (2015). Bacterial infection remodels the DNA methylation landscape of human dendritic cells. *Genome Research*, 25(12), 1801-1811. <https://doi.org/10.1101/gr.192005.115>
- Palmela, C., Chevarin, C., Xu, Z., Torres, J., Sevrin, G., Hirten, R., Barnich, N., Ng, S. C., & Colombel, J.-F. (2018). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*, 67(3), 574-587. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314903>
- Palomino-Morales, R. J., Oliver, J., Gómez-García, M., López-Nevot, M. A., Rodrigo, L., Nieto, A., Alizadeh, B. Z., & Martín, J. (2009). Association of ATG16L1 and IRGM genes polymorphisms with inflammatory bowel disease : A meta-analysis approach. *Genes and Immunity*, 10(4), 356-364. <https://doi.org/10.1038/gene.2009.25>
- Pan, W.-H., Sommer, F., Falk-Paulsen, M., Ulas, T., Best, P., Fazio, A., Kachroo, P., Luzius, A., Jentsch, M., Rehman, A., Müller, F., Lengauer, T., Walter, J., Künzel, S., Baines, J. F., Schreiber, S., Franke, A., Schultze, J. L., Bäckhed, F., & Rosenstiel, P. (2018). Exposure to the gut microbiota drives distinct methylome and transcriptome changes in intestinal epithelial cells during postnatal development. *Genome Medicine*, 10, 27. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0534-5>
- Pandey, S. C., Ugale, R., Zhang, H., Tang, L., & Prakash, A. (2008). Brain Chromatin Remodeling : A Novel Mechanism of Alcoholism. *The Journal of Neuroscience*, 28(14), 3729-3737. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5731-07.2008>
- Parada Venegas, D., De la Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H. J. M., Faber, K. N., & Hermoso, M. A. (2019). Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in Immunology*, 10, 277. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>
- Park, J. K., Shon, S., Yoo, H. J., Suh, D.-H., Bae, D., Shin, J., Jun, J. H., Ha, N., Song, H., Choi, Y. I., Pap, T., & Song, Y. W. (2021). Inhibition of histone deacetylase 6 suppresses inflammatory responses and invasiveness of fibroblast-like-synoviocytes in inflammatory arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 23(1), 177. <https://doi.org/10.1186/s13075-021-02561-4>
- Park, S.-Y., & Kim, J.-S. (2020). A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(2), 204-212. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0382-4>
- Parkes, M., Barrett, J. C., Prescott, N. J., Tremelling, M., Anderson, C. A., Fisher, S. A., Roberts, R. G., Nimmo, E. R., Cummings, F. R., Soars, D., Drummond, H., Lees, C. W., Khawaja, S. A., Bagnall, R., Burke, D. A., Todhunter, C. E., Ahmad, T., Onnie, C. M., McArdle, W., ... Mathew, C. G. (2007). Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature Genetics*, 39(7), 830-832. <https://doi.org/10.1038/ng2061>
- Pascal, V., Pozuelo, M., Borruel, N., Casellas, F., Campos, D., Santiago, A., Martinez, X., Varela, E., Sarrabayrouse, G., Machiels, K., Vermeire, S., Sokol, H., Guarner, F., & Manichanh, C. (2017). A microbial signature for Crohn's disease. *Gut*, 66(5), 813-822. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313235>
- Patel, J. H., Du, Y., Ard, P. G., Phillips, C., Carella, B., Chen, C.-J., Rakowski, C., Chatterjee, C., Lieberman, P. M., Lane, W. S., Blobel, G. A., & McMahon, S. B. (2004). The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Molecular and Cellular Biology*, 24(24), 10826-10834. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.24.10826-10834.2004>
- Patterson, J. (2021). EFFECTIVENESS OF ANTIBIOTICS AS A TREATMENT OPTION FOR PATIENTS WITH CROHN'S DISEASE : A META ANALYSIS. *Gastroenterology*, 160(3), S9. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.01.052>

- Patzer, S. I., & Hantke, K. (1998). The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 28(6), 1199-1210. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00883.x>
- Patzer, S. I., & Hantke, K. (2000). The zinc-responsive regulator Zur and its control of the znu gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24321-24332. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001775200>
- Paul, B., Barnes, S., Demark-Wahnefried, W., Morrow, C., Salvador, C., Skibola, C., & Tollefsbol, T. O. (2015). Influences of diet and the gut microbiome on epigenetic modulation in cancer and other diseases. *Clinical Epigenetics*, 7, 112. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0144-7>
- Pazhoohan, S., Satarian, L., Asghari, A.-A., Salimi, M., Kiani, S., Mani, A.-R., & Javan, M. (2014). Valproic Acid attenuates disease symptoms and increases endogenous myelin repair by recruiting neural stem cells and oligodendrocyte progenitors in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuro-Degenerative Diseases*, 13(1), 45-52. <https://doi.org/10.1159/000352021>
- Peck, B. C. E., Weiser, M., Lee, S. E., Gipson, G. R., Iyer, V. B., Sartor, R. B., Herfarth, H. H., Long, M. D., Hansen, J. J., Isaacs, K. L., Trembath, D. G., Rahbar, R., Sadiq, T. S., Furey, T. S., Sethupathy, P., & Sheikh, S. Z. (2015). MicroRNAs Classify Different Disease Behavior Phenotypes of Crohn's Disease and May Have Prognostic Utility. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(9), 2178-2187. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000478>
- Pennazio, M., Spada, C., Eliakim, R., Keuchel, M., May, A., Mulder, C. J., Rondonotti, E., Adler, S. N., Albert, J., Baltés, P., Barbaro, F., Cellier, C., Charton, J. P., Delvaux, M., Despott, E. J., Domagk, D., Klein, A., McAlindon, M., Rosa, B., ... Gralnek, I. M. (2015). Small-bowel capsule endoscopy and device-assisted enteroscopy for diagnosis and treatment of small-bowel disorders : European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline. *Endoscopy*, 47(4), 352-376. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1391855>
- Pennini, M. E., Pai, R. K., Schultz, D. C., Boom, W. H., & Harding, C. V. (2006). Mycobacterium tuberculosis 19-kDa Lipoprotein Inhibits IFN- $\gamma$ -Induced Chromatin Remodeling of MHC2TA by TLR2 and MAPK Signaling. *The Journal of Immunology*, 176(7), 4323-4330. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.7.4323>
- Pereira, J. M., Chevalier, C., Chaze, T., Gianetto, Q., Impens, F., Matondo, M., Cossart, P., & Hamon, M. A. (2018). Infection Reveals a Modification of SIRT2 Critical for Chromatin Association. *Cell Reports*, 23(4), 1124-1137. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.116>
- Pérez-Brocal, V., García-López, R., Vázquez-Castellanos, J. F., Nos, P., Beltrán, B., Latorre, A., & Moya, A. (2013). Study of the Viral and Microbial Communities Associated With Crohn's Disease : A Metagenomic Approach. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 4(6), e36. <https://doi.org/10.1038/ctg.2013.9>
- Pero, R., Peluso, S., Angrisano, T., Tuccillo, C., Sacchetti, S., Keller, S., Tomaiuolo, R., Bruni, C. B., Lembo, F., & Chiariotti, L. (2011). Chromatin and DNA methylation dynamics of *Helicobacter pylori*-induced COX-2 activation. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 301(2), 140-149. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.06.009>
- Peter, C. J., Fischer, L. K., Kundakovic, M., Garg, P., Jakovcevski, M., Dincer, A., Amaral, A. C., Ginns, E. I., Galdzicka, M., Bryce, C. P., Ratner, C., Waber, D. P., Mokler, D., Medford, G., Champagne, F. A., Rosene, D. L., McGaughy, J. A., Sharp, A. J., Galler, J. R., & Akbarian, S. (2016). DNA METHYLATION SIGNATURES OF EARLY CHILDHOOD MALNUTRITION ASSOCIATED WITH IMPAIRMENTS IN ATTENTION AND COGNITION. *Biological psychiatry*, 80(10), 765-774. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.03.2100>
- Peters, V., Bolte, L., Schuttert, E. [Monique], Andreu-Sánchez, S., Dijkstra, G., Weersma, R. [Karel], & Campmans-Kuijpers, M. [Johanna E. (2022)]. Western and Carnivorous Dietary Patterns are Associated with Greater Likelihood of IBD Development in a Large Prospective Population-based Cohort. *Journal of Crohn's and Colitis*, 16(6), 931-939. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjab219>
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells : Regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews. Immunology*, 14(3), 141-153. <https://doi.org/10.1038/nri3608>

- Petnicki-Ocwieja, T., Hrcir, T., Liu, Y.-J., Biswas, A., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H., & Kobayashi, K. S. (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), 15813-15818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907722106>
- Peyrin-Biroulet, L., Ferrante, M., Magro, F., Campbell, S., Franchimont, D., Fidder, H., Strid, H., Ardizzone, S., Veereman-Wauters, G., Chevaux, J.-B., Allez, M., Danese, S., & Sturm, A. (2011). Results from the 2nd Scientific Workshop of the ECCO (I) : Impact of mucosal healing on the course of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, *5*(5), 477-483. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2011.06.009>
- Peyrin-Biroulet, L., Sandborn, W., Sands, B. E., Reinisch, W., Bemelman, W., Bryant, R. V., D'Haens, G., Dotan, I., Dubinsky, M., Feagan, B., Fiorino, G., Gearry, R., Krishnareddy, S., Lakatos, P. L., Loftus, E. V., Marteau, P., Munkholm, P., Murdoch, T. B., Ordás, I., ... Colombel, J.-F. (2015). Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE) : Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target. *The American Journal of Gastroenterology*, *110*(9), 1324-1338. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.233>
- Pflum, M. K., Tong, J. K., Lane, W. S., & Schreiber, S. L. (2001). Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(50), 47733-47741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105590200>
- Picco, M. F., & Bayless, T. M. (2003). Tobacco consumption and disease duration are associated with fistulizing and stricturing behaviors in the first 8 years of Crohn's disease. *The American Journal of Gastroenterology*, *98*(2), 363-368. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2003.07240.x>
- Pietrzak, B., Tomela, K., Olejnik-Schmidt, A., Mackiewicz, A., & Schmidt, M. (2020). Secretory IgA in Intestinal Mucosal Secretions as an Adaptive Barrier against Microbial Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(23), 9254. <https://doi.org/10.3390/ijms21239254>
- Pineton de Chambrun, G., Peyrin-Biroulet, L., Lémann, M., & Colombel, J.-F. (2010). Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *7*(1), 1. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2009.203>
- Plissonneau, C., Sivignon, A., Chassaing, B., Capel, F., Martin, V., Etienne, M., Wawrzyniak, I., Chausse, P., Dutheil, F., Mairesse, G., Chesneau, G., Boisseau, N., & Barnich, N. (2022). Beneficial Effects of Linseed Supplementation on Gut Mucosa-Associated Microbiota in a Physically Active Mouse Model of Crohn's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(11), 5891. <https://doi.org/10.3390/ijms23115891>
- Png, C. W., Lindén, S. K., Gilshenan, K. S., Zoetendal, E. G., McSweeney, C. S., Sly, L. I., McGuckin, M. A., & Florin, T. H. J. (2010). Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *The American Journal of Gastroenterology*, *105*(11), 2420-2428. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.281>
- Poupeau, A., Garde, C., Sulek, K., Citirikaya, K., Treebak, J. T., Arumugam, M., Simar, D., Olofsson, L. E., Bäckhed, F., & Barrès, R. (2019). Genes controlling the activation of natural killer lymphocytes are epigenetically remodeled in intestinal cells from germ-free mice. *The FASEB Journal*, *33*(2), 2719-2731. <https://doi.org/10.1096/fj.201800787R>
- Prakash, S., Rodes, L., Coussa-Charley, M., & Tomaro-Duchesneau, C. (2011). Gut microbiota : Next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics : Targets & Therapy*, *5*, 71-86. <https://doi.org/10.2147/BTT.S19099>
- Prescott, N. J., Dominy, K. M., Kubo, M., Lewis, C. M., Fisher, S. A., Redon, R., Huang, N., Stranger, B. E., Blaszczyk, K., Hudspith, B., Parkes, G., Hosono, N., Yamazaki, K., Onnie, C. M., Forbes, A., Dermitzakis, E. T., Nakamura, Y., Mansfield, J. C., Sanderson, J., ... Mathew, C. G. (2010). Independent and population-specific association of risk variants at the IRGM locus with Crohn's disease. *Human Molecular Genetics*, *19*(9), 1828-1839. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq041>
- Prescott, N. J., Fisher, S. A., Franke, A., Hampe, J., Onnie, C. M., Soars, D., Bagnall, R., Mirza, M. M., Sanderson, J., Forbes, A., Mansfield, J. C., Lewis, C. M., Schreiber, S., & Mathew, C. G. (2007). A nonsynonymous SNP in ATG16L1



- predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology*, *132*(5), 1665-1671. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.034>
- Prosberg, M., Bendtsen, F., Vind, I., Petersen, A. M., & Gluud, L. L. (2016). The association between the gut microbiota and the inflammatory bowel disease activity: A systematic review and meta-analysis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *51*(12), 1407-1415. <https://doi.org/10.1080/00365521.2016.1216587>
- Prunicki, M., Cauwenberghs, N., Lee, J., Zhou, X., Movassagh, H., Noth, E., Lurmann, F., Hammond, S. K., Balmes, J. R., Desai, M., Wu, J. C., & Nadeau, K. C. (2021). Air pollution exposure is linked with methylation of immunoregulatory genes, altered immune cell profiles, and increased blood pressure in children. *Scientific Reports*, *11*, 4067. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83577-3>
- Prunicki, M., Stell, L., Dinakarparandian, D., de Planell-Saguer, M., Lucas, R. W., Hammond, S. K., Balmes, J. R., Zhou, X., Paglino, T., Sabatti, C., Miller, R. L., & Nadeau, K. C. (2018). Exposure to NO<sub>2</sub>, CO, and PM<sub>2.5</sub> is linked to regional DNA methylation differences in asthma. *Clinical Epigenetics*, *10*, 2. <https://doi.org/10.1186/s13148-017-0433-4>
- Pugacheva, E. N., Jablonski, S. A., Hartman, T. R., Henske, E. P., & Golemis, E. A. (2007). HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell*, *129*(7), 1351-1363. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.035>
- Qiao, C.-X., Xu, S., Wang, D.-D., Gao, S.-Y., Zhao, S.-F., Zhang, M.-L., Yu, B., Yin, Q., & Zhao, G. (2018). MicroRNA-19b alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory injury in human intestinal cells by up-regulation of Runx3. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *22*(16), 5284-5294. [https://doi.org/10.26355/eurev\\_201808\\_15728](https://doi.org/10.26355/eurev_201808_15728)
- Qin, W., Scicluna, B. P., & van der Poll, T. (2021). The Role of Host Cell DNA Methylation in the Immune Response to Bacterial Infection. *Frontiers in Immunology*, *12*, 696280. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.696280>
- Qiu, Y., Liu, L., Zhao, C., Han, C., Li, F., Zhang, J., Wang, Y., Li, G., Mei, Y., Wu, M., Wu, J., & Shi, Y. (2012). Combinatorial readout of unmodified H3R2 and acetylated H3K14 by the tandem PHD finger of MOZ reveals a regulatory mechanism for HOXA9 transcription. *Genes & Development*, *26*(12), 1376-1391. <https://doi.org/10.1101/gad.188359.112>
- Rahmani, S., Breyner, N. M., Su, H.-M., Verdu, E. F., & Didar, T. F. (2019). Intestinal organoids: A new paradigm for engineering intestinal epithelium in vitro. *Biomaterials*, *194*, 195-214. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.12.006>
- Raisch, J., Darfeuille-Michaud, A., & Hang Thi Thu Nguyen, -. (2013). Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World Journal of Gastroenterology*, *19*(20), 2985-2996. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i20.2985>
- Rajeev, R., Dwivedi, A. P., Sinha, A., Agarwaal, V., Dev, R. R., Kar, A., & Khosla, S. (2021). Epigenetic interaction of microbes with their mammalian hosts. *Journal of Biosciences*, *46*(4), 94. <https://doi.org/10.1007/s12038-021-00215-w>
- Ramanan, D., Tang, M. S., Bowcutt, R., Loke, P., & Cadwell, K. (2014). Bacterial sensor Nod2 prevents inflammation of the small intestine by restricting the expansion of the commensal *Bacteroides vulgatus*. *Immunity*, *41*(2), 311-324. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.015>
- Ramos-Molina, B., Sánchez-Alcoholado, L., Cabrera-Mulero, A., Lopez-Dominguez, R., Carmona-Saez, P., Garcia-Fuentes, E., Moreno-Indias, I., & Tinahones, F. J. (2019). Gut Microbiota Composition Is Associated With the Global DNA Methylation Pattern in Obesity. *Frontiers in Genetics*, *10*, 613. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00613>
- Rasmussen, L., Knorr, S., Antoniussen, C. S., Bruun, J. M., Ovesen, P. G., Fuglsang, J., & Kampmann, U. (2021). The Impact of Lifestyle, Diet and Physical Activity on Epigenetic Changes in the Offspring—A Systematic Review. *Nutrients*, *13*(8), 2821. <https://doi.org/10.3390/nu13082821>
- Raso, T., Crivellaro, S., Chirillo, M. G., Pais, P., Gaia, E., & Savoia, D. (2011). Analysis of *Escherichia coli* isolated from patients affected by Crohn's disease. *Current Microbiology*, *63*(2), 131-137. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9947-8>



- Rehman, A., Sina, C., Gavrilova, O., Häslér, R., Ott, S., Baines, J. F., Schreiber, S., & Rosenstiel, P. (2011). Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut*, *60*(10), 1354-1362. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.216259>
- Reisacher, C., & Arbibe, L. (2019). Not lost in host translation : The new roles of long noncoding RNAs in infectious diseases. *Cellular Microbiology*, *21*(11), e13119. <https://doi.org/10.1111/cmi.13119>
- Rennoll-Bankert, K. E., Garcia-Garcia, J. C., Sinclair, S. H., & Dumler, J. S. (2015). Chromatin-bound bacterial effector ankyrin A recruits histone deacetylase 1 and modifies host gene expression. *Cellular Microbiology*, *17*(11), 1640-1652. <https://doi.org/10.1111/cmi.12461>
- Restrepo, R. J., Lim, R. W., Korthuis, R. J., & Shukla, S. D. (2017). Binge alcohol alters PNPLA3 levels in liver through epigenetic mechanism involving histone H3 acetylation. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, *60*, 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2017.01.009>
- Reyes, A., Haynes, M., Hanson, N., Angly, F. E., Heath, A. C., Rohwer, F., & Gordon, J. I. (2010). Viruses in the fecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*, *466*(7304), 334-338. <https://doi.org/10.1038/nature09199>
- Rhodes, L. V., Tate, C. R., Segar, H. C., Burks, H. E., Phamduy, T. B., Hoang, V., Elliott, S., Gilliam, D., Pounder, F. N., Anbalagan, M., Chrisey, D. B., Rowan, B. G., Burow, M. E., & Collins-Burow, B. M. (2014). Suppression of triple-negative breast cancer metastasis by pan-DAC inhibitor panobinostat via inhibition of ZEB family of EMT master regulators. *Breast cancer research and treatment*, *145*(3), 593-604. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-2979-6>
- Rioux, J. D., Xavier, R. J., Taylor, K. D., Silverberg, M. S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, M. M., Datta, L. W., Shugart, Y. Y., Griffiths, A. M., Targan, S. R., Ippoliti, A. F., Bernard, E.-J., Mei, L., Nicolae, D. L., Regueiro, M., Schumm, L. P., ... Brant, S. R. (2007). Genome-wide association study identifies five novel susceptibility loci for Crohn's disease and implicates a role for autophagy in disease pathogenesis. *Nature genetics*, *39*(5), 596-604. <https://doi.org/10.1038/ng2032>
- Rivas, M. A., Beaudoin, M., Gardet, A., Stevens, C., Sharma, Y., Zhang, C. K., Boucher, G., Ripke, S., Ellinghaus, D., Burt, N., Fennell, T., Kirby, A., Latiano, A., Goyette, P., Green, T., Halfvarson, J., Haritunians, T., Korn, J. M., Kuruvilla, F., ... Daly, M. J. (2011). Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nature Genetics*, *43*(11), 1066-1073. <https://doi.org/10.1038/ng.952>
- Roberts, C. L., Rushworth, S. L., Richman, E., & Rhodes, J. M. (2013). Hypothesis : Increased consumption of emulsifiers as an explanation for the rising incidence of Crohn's disease. *Journal of Crohn's & Colitis*, *7*(4), 338-341. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.01.004>
- Roberts, R. L., Hollis-Moffatt, J. E., Geary, R. B., Kennedy, M. A., Barclay, M. L., & Merriman, T. R. (2008). Confirmation of association of IRGM and NCF4 with ileal Crohn's disease in a population-based cohort. *Genes and Immunity*, *9*(6), 561-565. <https://doi.org/10.1038/gene.2008.49>
- Roda, G., Chien Ng, S., Kotze, P. G., Argollo, M., Panaccione, R., Spinelli, A., Kaser, A., Peyrin-Biroulet, L., & Danese, S. (2020). Crohn's disease. *Nature Reviews Disease Primers*, *6*(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0156-2>
- Rohr, M. W., Narasimhulu, C. A., Rudeski-Rohr, T. A., & Parthasarathy, S. (2020). Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability : A Review. *Advances in Nutrition*, *11*(1), 77-91. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz061>
- Rolando, M., Sanulli, S., Rusniok, C., Gomez-Valero, L., Bertholet, C., Sahr, T., Margueron, R., & Buchrieser, C. (2013). Legionella pneumophila effector RomA uniquely modifies host chromatin to repress gene expression and promote intracellular bacterial replication. *Cell Host & Microbe*, *13*(4), 395-405. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.004>
- Rolhion, N., Barnich, N., Bringer, M.-A., Glasser, A.-L., Ranc, J., Hébuterne, X., Hofman, P., & Darfeuille-Michaud, A. (2010). Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive Escherichia coli invasion. *Gut*, *59*(10), 1355-1362. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.207456>

- Rolhion, N., Barnich, N., Claret, L., & Darfeuille-Michaud, A. (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), 2286-2296. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2286-2296.2005>
- Rolhion, N., Hofman, P., & Darfeuille-Michaud, A. (2011). The endoplasmic reticulum stress response chaperone : Gp96, a host receptor for Crohn disease-associated adherent-invasive Escherichia coli. *Gut Microbes*, *2*(2), 115-119. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.2.15725>
- Romagnolo, D. F., Donovan, M. G., Doetschman, T. C., & Selmin, O. I. (2019). N-6 Linoleic Acid Induces Epigenetics Alterations Associated with Colonic Inflammation and Cancer. *Nutrients*, *11*(1), 171. <https://doi.org/10.3390/nu11010171>
- Romieu, P., Deschatrettes, E., Host, L., Gobaille, S., Sandner, G., & Zwiller, J. (2011). The Inhibition of Histone Deacetylases Reduces the Reinstatement of Cocaine-Seeking Behavior in Rats. *Current Neuropharmacology*, *9*(1), 21-25. <https://doi.org/10.2174/157015911795017317>
- Romieu, P., Host, L., Gobaille, S., Sandner, G., Aunis, D., & Zwiller, J. (2008). Histone deacetylase inhibitors decrease cocaine but not sucrose self-administration in rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(38), 9342-9348. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0379-08.2008>
- Romoli, M., Mazzocchetti, P., D'Alonzo, R., Siliquini, S., Rinaldi, V. E., Verrotti, A., Calabresi, P., & Costa, C. (2019). Valproic Acid and Epilepsy : From Molecular Mechanisms to Clinical Evidences. *Current Neuropharmacology*, *17*(10), 926-946. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666181227165722>
- Roostae, A., Guezguez, A., Beauséjour, M., Simoneau, A., Vachon, P. H., Levy, E., & Beaulieu, J. (2015). Histone Deacetylase Inhibition Impairs Normal Intestinal Cell Proliferation and Promotes Specific Gene Expression. *Journal of Cellular Biochemistry*, *116*(11), 2695-2708. <https://doi.org/10.1002/jcb.25274>
- Röth, D., Chiang, A. J., Hu, W., Gugiu, G. B., Morra, C. N., Versalovic, J., & Kalkum, M. (2019). Two-carbon folate cycle of commensal Lactobacillus reuteri 6475 gives rise to immunomodulatory ethionine, a source for histone ethylation. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *33*(3), 3536-3548. <https://doi.org/10.1096/fj.201801848R>
- Rufini, S., Ciccacci, C., Di Fusco, D., Ruffa, A., Pallone, F., Novelli, G., Biancone, L., & Borgiani, P. (2015). Autophagy and inflammatory bowel disease : Association between variants of the autophagy-related IRGM gene and susceptibility to Crohn's disease. *Digestive and Liver Disease*, *47*(9), 744-750. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2015.05.012>
- Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics : Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, *16*(3), 203-222. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246>
- Rutgeerts, P., Hiele, M., Geboes, K., Peeters, M., Penninckx, F., Aerts, R., & Kerremans, R. (1995). Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of Crohn's recurrence after ileal resection. *Gastroenterology*, *108*(6), 1617-1621. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(95\)90121-3](https://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90121-3)
- Sada, N., Fujita, Y., Mizuta, N., Ueno, M., Furukawa, T., & Yamashita, T. (2020). Inhibition of HDAC increases BDNF expression and promotes neuronal rewiring and functional recovery after brain injury. *Cell Death & Disease*, *11*(8), 8. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02897-w>
- Sadaghian Sadabad, M., Regeling, A., de Goffau, M. C., Blokzijl, T., Weersma, R. K., Penders, J., Faber, K. N., Harmsen, H. J. M., & Dijkstra, G. (2015). The ATG16L1-T300A allele impairs clearance of pathosymbionts in the inflamed ileal mucosa of Crohn's disease patients. *Gut*, *64*(10), 1546-1552. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307289>
- Sadler, T., Bhasin, J. M., Xu, Y., Barnholz-Sloan, J., Chen, Y., Ting, A. H., & Stylianou, E. (2016). Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression defines molecular characteristics of Crohn's disease-associated fibrosis. *Clinical Epigenetics*, *8*, 30. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0193-6>

- Saha, R., & Pahan, K. (2006). HATs and HDACs in neurodegeneration : A tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell death and differentiation*, 13(4), 539-550. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401769>
- Saitz, W., Montero, D. A., Pardo, M., Araya, D., De la Fuente, M., Hermoso, M. A., Farfán, M. J., Ginard, D., Rosselló-Móra, R., Rasko, D. A., Del Canto, F., & Vidal, R. M. (2022). Characterization of Adherent-Invasive Escherichia coli (AIEC) Outer Membrane Proteins Provides Potential Molecular Markers to Screen Putative AIEC Strains. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9005. <https://doi.org/10.3390/ijms23169005>
- Salem, M., Ammitzboell, M., Nys, K., Seidelin, J. B., & Nielsen, O. H. (2015). ATG16L1 : A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease. *Autophagy*, 11(4), 585-594. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1017187>
- Sanchez, R., & Zhou, M.-M. (2009). The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Current opinion in drug discovery & development*, 12(5), 659-665.
- Sanderson, I. R., Boulton, P., Menzies, I., & Walker-Smith, J. A. (1987). Improvement of abnormal lactulose/rhamnose permeability in active Crohn's disease of the small bowel by an elemental diet. *Gut*, 28(9), 1073-1076.
- Santoro, F., Botrugno, O. A., Dal Zuffo, R., Pallavicini, I., Matthews, G. M., Cluse, L., Barozzi, I., Senese, S., Fornasari, L., Moretti, S., Altucci, L., Pelicci, P. G., Chiocca, S., Johnstone, R. W., & Minucci, S. (2013). A dual role for Hdac1 : Oncosuppressor in tumorigenesis, oncogene in tumor maintenance. *Blood*, 121(17), 3459-3468. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-461988>
- Santos, M. P. C., Gomes, C., & Torres, J. (2018). Familial and ethnic risk in inflammatory bowel disease. *Annals of Gastroenterology*, 31(1), 14-23. <https://doi.org/10.20524/aog.2017.0208>
- Sarkar, S., Abujamra, A. L., Loew, J. E., Forman, L. W., Perrine, S. P., & Faller, D. V. (2011). Histone deacetylase inhibitors reverse CpG methylation by regulating DNMT1 through ERK signaling. *Anticancer Research*, 31(9), 2723-2732.
- Sartor, R. B. (2012). Diet promotes dysbiosis and colitis in susceptible hosts. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(10), 561-562. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.157>
- Sasaki, M., Sitaraman, S. V., Babbin, B. A., Gerner-Smith, P., Ribot, E. M., Garrett, N., Alpern, J. A., Akyildiz, A., Theiss, A. L., Nusrat, A., & Klapproth, J.-M. A. (2007). Invasive Escherichia coli are a feature of Crohn's disease. *Laboratory Investigation*, 87(10), 10. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700661>
- Saxena, A., Fletcher, E., Larsen, B., Baliga, M. S., Durstine, J. L., & Fayad, R. (2012). Effect of exercise on chemically-induced colitis in adiponectin deficient mice. *Journal of Inflammation (London, England)*, 9, 30. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-9-30>
- Sc, N., Kk, T., Ma, K., B, X., J, W., Fk, C., & Jj, S. (2012). Genetics of inflammatory bowel disease in Asia : Systematic review and meta-analysis. *Inflammatory bowel diseases*, 18(6). <https://doi.org/10.1002/ibd.21845>
- Schaefer, J. S., Attumi, T., Opekun, A. R., Abraham, B., Hou, J., Shelby, H., Graham, D. Y., Streckfus, C., & Klein, J. R. (2015). MicroRNA signatures differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis. *BMC Immunology*, 16, 5. <https://doi.org/10.1186/s12865-015-0069-0>
- Schaible, T. D., Harris, R. A., Dowd, S. E., Smith, C. W., & Kellermayer, R. (2011). Maternal methyl-donor supplementation induces prolonged murine offspring colitis susceptibility in association with mucosal epigenetic and microbiomic changes. *Human Molecular Genetics*, 20(9), 1687-1696. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr044>
- Scharl, M., Paul, G., Weber, A., Jung, B. C., Docherty, M. J., Hausmann, M., Rogler, G., Barrett, K. E., & McCole, D. F. (2009). Protection of epithelial barrier function by the Crohn's disease associated gene, protein tyrosine phosphatase N2. *Gastroenterology*, 137(6), 2030-2040.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.07.078>

- Schaubeck, M., Clavel, T., Calasan, J., Lagkouvardos, I., Haange, S. B., Jehmlich, N., Basic, M., Dupont, A., Hornef, M., von Bergen, M., Bleich, A., & Haller, D. (2016). Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut*, *65*(2), 225-237. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309333>
- Schernhammer, E. S., Giovannucci, E., Kawasaki, T., Rosner, B., Fuchs, C. S., & Ogino, S. (2010). DIETARY FOLATE, ALCOHOL, AND B VITAMINS IN RELATION TO LINE-1 HYPOMETHYLATION IN COLON CANCER. *Gut*, *59*(6), 794-799. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.183707>
- Scheving, L. A. (2000). Biological clocks and the digestive system. *Gastroenterology*, *119*(2), 536-549. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.9305>
- Schmitz, J. M., Tonkonogy, S. L., Dogan, B., Leblond, A., Whitehead, K. J., Kim, S. C., Simpson, K. W., & Sartor, R. B. (2019). Murine Adherent and Invasive E. coli Induces Chronic Inflammation and Immune Responses in the Small and Large Intestines of Monoassociated IL-10<sup>-/-</sup> Mice Independent of Long Polar Fimbriae Adhesin A. *Inflammatory Bowel Diseases*, *25*(5), 875-885. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy386>
- Schoch, C. L., Ciufu, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy : A comprehensive update on curation, resources and tools. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, *2020*, baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Schroeder, B. O., Birchenough, G. M. H., Ståhlman, M., Arike, L., Johansson, M. E. V., Hansson, G. C., & Bäckhed, F. (2018). Bifidobacteria or fiber protect against diet-induced microbiota-mediated colonic mucus deterioration. *Cell host & microbe*, *23*(1), 27-40.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.11.004>
- Schroeder, F. A., Lin, C. L., Crusio, W. E., & Akbarian, S. (2007). Antidepressant-Like Effects of the Histone Deacetylase Inhibitor, Sodium Butyrate, in the Mouse. *Biological Psychiatry*, *62*(1), 55-64. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.06.036>
- Schultsz, C., van den Berg, F. M., ten Kate, F. W., Tytgat, G. N. J., & Dankert, J. (1999). The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology*, *117*(5), 1089-1097. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(99\)70393-8](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(99)70393-8)
- Schulze, J. M., Wang, A. Y., & Kobor, M. S. (2009). YEATS domain proteins : A diverse family with many links to chromatin modification and transcription. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, *87*(1), 65-75. <https://doi.org/10.1139/O08-111>
- Schwartz, D., Shafran, I., Romero, C., Piromalli, C., Biggerstaff, J., Naser, N., Chamberlin, W., & Naser, S. A. (2000). Use of short-term culture for identification of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis in tissue from Crohn's disease patients. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *6*(6), 303-307. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00093.x>
- Segré, C. V., & Chiocca, S. (2011). Regulating the Regulators : The Post-Translational Code of Class I HDAC1 and HDAC2. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2011*, 690848. <https://doi.org/10.1155/2011/690848>
- Seksik, P., Nion-Larmurier, I., Sokol, H., Beaugerie, L., & Cosnes, J. (2009). Effects of light smoking consumption on the clinical course of Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *15*(5), 734-741. <https://doi.org/10.1002/ibd.20828>
- Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., & Doré, J. (2003). Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, *52*(2), 237-242.
- Selby, W., Pavli, P., Crotty, B., Florin, T., Radford-Smith, G., Gibson, P., Mitchell, B., Connell, W., Read, R., Merrett, M., Ee, H., Hetzel, D., & Antibiotics in Crohn's Disease Study Group. (2007). Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology*, *132*(7), 2313-2319. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.031>



- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*, *14*(8), e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Senese, S., Zaragoza, K., Minardi, S., Muradore, I., Ronzoni, S., Passafaro, A., Bernard, L., Draetta, G. F., Alcalay, M., Seiser, C., & Chiocca, S. (2007). Role for Histone Deacetylase 1 in Human Tumor Cell Proliferation. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(13), 4784-4795. <https://doi.org/10.1128/MCB.00494-07>
- Sengupta, S., Nayak, B., Meuli, M., Sander, P., Mishra, S., & Sonawane, A. (2021). Mycobacterium tuberculosis Phosphoribosyltransferase Promotes Bacterial Survival in Macrophages by Inducing Histone Hypermethylation in Autophagy-Related Genes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.676456>
- Seo, H.-W., Kim, E.-J., Na, H., & Lee, M.-O. (2009). Transcriptional activation of hypoxia-inducible factor-1alpha by HDAC4 and HDAC5 involves differential recruitment of p300 and FIH-1. *FEBS Letters*, *583*(1), 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.11.044>
- Sepehri, S., Kotlowski, R., Bernstein, C. N., & Krause, D. O. (2007). Microbial diversity of inflamed and noninflamed gut biopsy tissues in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *13*(6), 675-683. <https://doi.org/10.1002/ibd.20101>
- Sepulveda, A. R., Yao, Y., Yan, W., Park, D. I., Kim, J. J., Gooding, W., Abudayyeh, S., & Graham, D. Y. (2010). CpG methylation and reduced expression of O6-methylguanine DNA methyltransferase is associated with Helicobacter pylori infection. *Gastroenterology*, *138*(5), 1836-1844. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.042>
- Serena, C., Millan, M., Ejarque, M., Saera-Vila, A., Maymó-Masip, E., Núñez-Roa, C., Monfort-Ferré, D., Terrón-Puig, M., Bautista, M., Menacho, M., Martí, M., Espin, E., Vendrell, J., & Fernández-Veledo, S. (2020). Adipose stem cells from patients with Crohn's disease show a distinctive DNA methylation pattern. *Clinical Epigenetics*, *12*, 53. <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00843-3>
- Seto, E., & Yang, X.-J. (2010). Regulation of Histone Deacetylase Activities and Functions by Phosphorylation and Dephosphorylation. In *Handbook of Cell Signaling* (p. 2379-2388). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00286-2>
- Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of Histone Acetylation : The Histone Deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(4), a018713. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018713>
- Sevrin, G., Massier, S., Chassaing, B., Agus, A., Delmas, J., Denizot, J., Billard, E., & Barnich, N. (2020). Adaptation of adherent-invasive E. coli to gut environment : Impact on flagellum expression and bacterial colonization ability. *Gut Microbes*, *11*(3), 364-380. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1421886>
- Sgambato, D., Miranda, A., Ranaldo, R., Federico, A., & Romano, M. (2017). The Role of Stress in Inflammatory Bowel Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, *23*(27), 3997-4002. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170228123357>
- Shafran, I., Kugler, L., Kl-Zaatari, F. A. X., Naser, S. A., & Sandoval, J. (2002). Open clinical trial of rifabutin and clarithromycin therapy in Crohn's disease. *Digestive and Liver Disease*, *34*(1), 22-28. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(02\)80055-X](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(02)80055-X)
- Shakespeare, M. R., Halili, M. A., Irvine, K. M., Fairlie, D. P., & Sweet, M. J. (2011). Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity. *Trends in Immunology*, *32*(7), 335-343. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.04.001>
- Shames, S. R., Bhavsar, A. P., Croxen, M. A., Law, R. J., Mak, S. H. C., Deng, W., Li, Y., Bidshari, R., de Hoog, C. L., Foster, L. J., & Finlay, B. B. (2011). The pathogenic Escherichia coli type III secreted protease NleC degrades the host acetyltransferase p300. *Cellular Microbiology*, *13*(10), 1542-1557. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01640.x>
- Shanahan, E. R., Shah, A., Koloski, N., Walker, M. M., Talley, N. J., Morrison, M., & Holtmann, G. J. (2018). Influence of cigarette smoking on the human duodenal mucosa-associated microbiota. *Microbiome*, *6*(1), 150. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0531-3>



- Sharma, G., Sowpati, D. T., Singh, P., Khan, M. Z., Ganji, R., Upadhyay, S., Banerjee, S., Nandicoori, V. K., & Khosla, S. (2016). Genome-wide non-CpG methylation of the host genome during *M. tuberculosis* infection. *Scientific Reports*, *6*, 25006. <https://doi.org/10.1038/srep25006>
- Sharma, G., Upadhyay, S., Srilalitha, M., Nandicoori, V. K., & Khosla, S. (2015). The interaction of mycobacterial protein Rv2966c with host chromatin is mediated through non-CpG methylation and histone H3/H4 binding. *Nucleic Acids Research*, *43*(8), 3922-3937. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv261>
- Sharma, S., & Taliyan, R. (2015). Transcriptional dysregulation in Huntington's disease : The role of histone deacetylases. *Pharmacological Research*, *100*, 157-169. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.08.002>
- Shawki, A., Ramirez, R., Spalinger, M. R., Ruegger, P. M., Sayoc-Becerra, A., Santos, A. N., Chatterjee, P., Canale, V., Mitchell, J. D., Macbeth, J. C., Gries, C. M., Tremblay, M. L., Hsiao, A., Borneman, J., & McCole, D. F. (2020). The autoimmune susceptibility gene, PTPN2, restricts expansion of a novel mouse adherent-invasive *E. coli*. *Gut Microbes*, *11*(6), 1547-1566. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1775538>
- Shen, W., Liu, J., Zhao, G., Fan, M., Song, G., Zhang, Y., Weng, Z., & Zhang, Y. (2017). Repression of Toll-like receptor-4 by microRNA-149-3p is associated with smoking-related COPD. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, *12*, 705-715. <https://doi.org/10.2147/COPD.S128031>
- Shin, C. M., Kim, N., Jung, Y., Park, J. H., Kang, G. H., Kim, J. S., Jung, H. C., & Song, I. S. (2010). Role of *Helicobacter pylori* infection in aberrant DNA methylation along multistep gastric carcinogenesis. *Cancer Science*, *101*(6), 1337-1346. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01535.x>
- Shin, C. M., Kim, N., Jung, Y., Park, J. H., Kang, G. H., Park, W.-Y., Kim, J. S., Jung, H. C., & Song, I. S. (2011). Genome-Wide DNA Methylation Profiles in Noncancerous Gastric Mucosae with Regard to *Helicobacter pylori* Infection and the Presence of Gastric Cancer. *Helicobacter*, *16*(3), 179-188. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2011.00838.x>
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.-M., Pazin, M. J., Davie, J. R., & Peterson, C. L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science (New York, N.Y.)*, *311*(5762), 844-847. <https://doi.org/10.1126/science.1124000>
- Shukla, S., & Tekwani, B. L. (2020). Histone Deacetylases Inhibitors in Neurodegenerative Diseases, Neuroprotection and Neuronal Differentiation. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 537. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00537>
- Sima, M., Rossnerova, A., Simova, Z., & Rossner, P. (2021). The Impact of Air Pollution Exposure on the MicroRNA Machinery and Lung Cancer Development. *Journal of Personalized Medicine*, *11*(1), 60. <https://doi.org/10.3390/jpm11010060>
- Simeoli, R., Mattace Raso, G., Pirozzi, C., Lama, A., Santoro, A., Russo, R., Montero-Melendez, T., Berni Canani, R., Calignano, A., Perretti, M., & Meli, R. (2017). An orally administered butyrate-releasing derivative reduces neutrophil recruitment and inflammation in dextran sulphate sodium-induced murine colitis. *British Journal of Pharmacology*, *174*(11), 1484-1496. <https://doi.org/10.1111/bph.13637>
- Simms, L. A., Doecke, J. D., Walsh, M. D., Huang, N., Fowler, E. V., & Radford-Smith, G. L. (2008). Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*, *57*(7), 903-910. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.142588>
- Simon, J. M., Davis, J. P., Lee, S. E., Schaner, M. R., Gipson, G. R., Weiser, M., Sartor, R. B., Herfarth, H. H., Rahbar, R., Sadiq, T. S., Koruda, M. J., McGovern, D. P., Lieb, J. D., Mohlke, K. L., Furey, T. S., & Sheikh, S. Z. (2016). Alterations to chromatin in intestinal macrophages link IL-10 deficiency to inappropriate inflammatory responses. *European journal of immunology*, *46*(8), 1912-1925. <https://doi.org/10.1002/eji.201546237>
- Simonsen, K. T., Nielsen, G., Bjerrum, J. V., Kruse, T., Kallipolitis, B. H., & Møller-Jensen, J. (2011). A Role for the RNA Chaperone Hfq in Controlling Adherent-Invasive *Escherichia coli* Colonization and Virulence. *PLoS ONE*, *6*(1), e16387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016387>

- Singh, N., Shirdel, E. A., Waldron, L., Zhang, R.-H., Jurisica, I., & Comelli, E. M. (2011). The Murine Caecal MicroRNA Signature Depends on the Presence of the Endogenous Microbiota. *International Journal of Biological Sciences*, 8(2), 171-186.
- Singh, R. P., Halaka, D. A., Hayouka, Z., & Tirosh, O. (2020). High-Fat Diet Induced Alteration of Mice Microbiota and the Functional Ability to Utilize Fructooligosaccharide for Ethanol Production. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00376>
- Sipponen, T., & Kolho, K.-L. (2015). Fecal calprotectin in diagnosis and clinical assessment of inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 50(1), 74-80. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.987809>
- Sipponen, T., Savilahti, E., Kolho, K.-L., Nuutinen, H., Turunen, U., & Färkkilä, M. (2008). Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin : Correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflammatory Bowel Diseases*, 14(1), 40-46. <https://doi.org/10.1002/ibd.20312>
- Sivignon, A., Chervy, M., Chevarin, C., Ragot, E., Billard, E., Denizot, J., & Barnich, N. (2022). An adherent-invasive Escherichia coli-colonized mouse model to evaluate microbiota-targeting strategies in Crohn's disease. *Disease Models & Mechanisms*, 15(10), dmm049707. <https://doi.org/10.1242/dmm.049707>
- Sivignon, A., de Vallée, A., Barnich, N., Denizot, J., Darcha, C., Pignède, G., Vandekerckove, P., & Darfeuille-Michaud, A. (2015). Saccharomyces cerevisiae CNCM I-3856 Prevents Colitis Induced by AIEC Bacteria in the Transgenic Mouse Model Mimicking Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(2), 276-286. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000280>
- Sivignon, A., Yan, X., Alvarez Dorta, D., Bonnet, R., Bouckaert, J., Fleury, E., Bernard, J., Gouin, S. G., Darfeuille-Michaud, A., & Barnich, N. (2015). Development of Heptylmannoside-Based Glycoconjugate Antiadhesive Compounds against Adherent-Invasive Escherichia coli Bacteria Associated with Crohn's Disease. *MBio*, 6(6), e01298-01215. <https://doi.org/10.1128/mBio.01298-15>
- Sivignon, A., Yu, S.-Y., Ballet, N., Vandekerckove, P., Barnich, N., & Guerardel, Y. (2021). Heteropolysaccharides from S. cerevisiae show anti-adhesive properties against E. coli associated with Crohn's disease. *Carbohydrate Polymers*, 271, 118415. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118415>
- Small, C.-L. N., Reid-Yu, S. A., McPhee, J. B., & Coombes, B. K. (2013). Persistent infection with Crohn's disease-associated adherent-invasive Escherichia coli leads to chronic inflammation and intestinal fibrosis. *Nature communications*, 4, 1957. <https://doi.org/10.1038/ncomms2957>
- Smith, E. R., Pannuti, A., Gu, W., Steurnagel, A., Cook, R. G., Allis, C. D., & Lucchesi, J. C. (2000). The drosophila MSL complex acetylates histone H4 at lysine 16, a chromatin modification linked to dosage compensation. *Molecular and Cellular Biology*, 20(1), 312-318. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.1.312-318.2000>
- Sokol, H., Brot, L., Stefanescu, C., Auzolle, C., Barnich, N., Buisson, A., Fumery, M., Pariente, B., Le Bourhis, L., Treton, X., Nancey, S., Allez, M., Seksik, P., & REMIND Study Group Investigators. (2020). Prominence of ileal mucosa-associated microbiota to predict postoperative endoscopic recurrence in Crohn's disease. *Gut*, 69(3), 462-472. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318719>
- Sokol, H., Conway, K. L., Zhang, M., Choi, M., Morin, B., Cao, Z., Villablanca, E. J., Li, C., Wijmenga, C., Yun, S. H., Shi, H. N., & Xavier, R. J. (2013). Card9 mediates intestinal epithelial cell restitution, T-helper 17 responses, and control of bacterial infection in mice. *Gastroenterology*, 145(3), 591-601.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.05.047>
- Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H.-P., Jegou, S., Landman, C., Cohen, D., Liguori, G., Bourrier, A., Nion-Larmurier, I., Cosnes, J., Seksik, P., Langella, P., Skurnik, D., Richard, M. L., & Beaugerie, L. (2017). Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*, 66(6), 1039-1048. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310746>
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H. M., Doré, J.,

- Marteau, P., Seksik, P., & Langella, P. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(43), 16731-16736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>
- Solem, C. A., Loftus Jr, E. V., Tremaine, W. J., Harmsen, W. S., Zinsmeister, A. R., & Sandborn, W. J. (2005). Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *11*(8), 707-712. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000173271.18319.53>
- Somineni, H. K., Venkateswaran, S., Kilaru, V., Marigorta, U. M., Mo, A., Okou, D. T., Kellermayer, R., Mondal, K., Cobb, D., Walters, T. D., Griffiths, A., Noe, J. D., Crandall, W. V., Rosh, J. R., Mack, D. R., Heyman, M. B., Baker, S. S., Stephens, M. C., Baldassano, R. N., ... Kugathasan, S. (2019). Blood-Derived DNA Methylation Signatures of Crohn's Disease and Severity of Intestinal Inflammation. *Gastroenterology*, *156*(8), 2254-2265.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.01.270>
- Spalinger, M. R., Manzini, R., Hering, L., Riggs, J. B., Gottier, C., Lang, S., Atrott, K., Fettelschoss, A., Olomski, F., Kündig, T. M., Fried, M., McCole, D. F., Rogler, G., & Scharl, M. (2018). PTPN2 Regulates Inflammasome Activation and Controls Onset of Intestinal Inflammation and Colon Cancer. *Cell reports*, *22*(7), 1835-1848. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.052>
- Spalinger, M. R., McCole, D. F., Rogler, G., & Scharl, M. (2016). Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2 and inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, *22*(3), 1034-1044. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i3.1034>
- Spalinger, M. R., Shawki, A., Chatterjee, P., Canale, V., Santos, A., Sayoc-Becerra, A., Scharl, M., Tremblay, M. L., Borneman, J., & McCole, D. F. (2022). Autoimmune susceptibility gene PTPN2 is required for clearance of adherent-invasive Escherichia coli by integrating bacterial uptake and lysosomal defence. *Gut*, *71*(1), 89-99. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323636>
- Spannhoff, A., Kim, Y. K., Raynal, N. J.-M., Gharibyan, V., Su, M.-B., Zhou, Y.-Y., Li, J., Castellano, S., Sbardella, G., Issa, J.-P. J., & Bedford, M. T. (2011). Histone deacetylase inhibitor activity in royal jelly might facilitate caste switching in bees. *EMBO Reports*, *12*(3), 238-243. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.9>
- Stappenbeck, T. S., & McGovern, D. P. B. (2017). Paneth Cell Alterations in the Development and Phenotype of Crohn's Disease. *Gastroenterology*, *152*(2), 322-326. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.003>
- Stidham, R. W., & Higgins, P. D. R. (2018). Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, *31*(3), 168-178. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1602237>
- Su, J. W., Ma, J. J., & Zhang, H. J. (2015). Use of antibiotics in patients with Crohn's disease : A systematic review and meta-analysis. *Journal of Digestive Diseases*, *16*(2), 58-66. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12216>
- Su, Z., & Denu, J. M. (2016). Reading the Combinatorial Histone Language. *ACS Chemical Biology*, *11*(3), 564-574. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00864>
- Sudo, T., Mimori, K., Nishida, N., Kogo, R., Iwaya, T., Tanaka, F., Shibata, K., Fujita, H., Shirouzu, K., & Mori, M. (2011). Histone deacetylase 1 expression in gastric cancer. *Oncology Reports*, *26*(4), 777-782. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1361>
- Suenaert, P., Bulteel, V., Lemmens, L., Noman, M., Geypens, B., Van Assche, G., Geboes, K., Ceuppens, J. L., & Rutgeerts, P. (2002). Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *The American Journal of Gastroenterology*, *97*(8), 2000-2004. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05914.x>
- Sun, B., Xing, K., Qi, C., Yan, K., & Xu, Y. (2020). Down-regulation of miR-215 attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory injury in CCD-18co cells by targeting GDF11 through the TLR4/NF-kB and JNK/p38 signaling pathways. *Histology and Histopathology*, *35*(12), 1473-1481. <https://doi.org/10.14670/HH-18-278>

- Sun, L., Telles, E., Karl, M., Cheng, F., Luetteke, N., Sotomayor, E. M., Miller, R. H., & Seto, E. (2018). Loss of HDAC11 ameliorates clinical symptoms in a multiple sclerosis mouse model. *Life Science Alliance*, 1(5), e201800039. <https://doi.org/10.26508/lisa.201800039>
- Sun, M., Wu, W., Liu, Z., & Cong, Y. (2017). Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *Journal of Gastroenterology*, 52(1), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s00535-016-1242-9>
- Sundar, I. K., & Rahman, I. (2016). Gene expression profiling of epigenetic chromatin modification enzymes and histone marks by cigarette smoke : Implications for COPD and lung cancer. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 311(6), L1245-L1258. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00253.2016>
- Sutherland, L. R., Ramcharan, S., Bryant, H., & Fick, G. (1990). Effect of cigarette smoking on recurrence of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 98(5 Pt 1), 1123-1128. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(90\)90324-t](https://doi.org/10.1016/0016-5085(90)90324-t)
- Svrcek, M., El-Murr, N., Wanherdrick, K., Dumont, S., Beaugerie, L., Cosnes, J., Colombel, J.-F., Tiret, E., Fléjou, J.-F., Lesuffleur, T., & Duval, A. (2013). Overexpression of microRNAs-155 and 21 targeting mismatch repair proteins in inflammatory bowel diseases. *Carcinogenesis*, 34(4), 828-834. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs408>
- Sweet, M. J., Shakespear, M. R., Kamal, N. A., & Fairlie, D. P. (2012). HDAC inhibitors : Modulating leukocyte differentiation, survival, proliferation and inflammation. *Immunology & Cell Biology*, 90(1), 14-22. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.88>
- Szulakowski, P., Crowther, A. J. L., Jiménez, L. A., Donaldson, K., Mayer, R., Leonard, T. B., MacNee, W., & Drost, E. M. (2006). The effect of smoking on the transcriptional regulation of lung inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174(1), 41-50. <https://doi.org/10.1164/rccm.200505-725OC>
- Taira, T., Yamaguchi, S., Takahashi, A., Okazaki, Y., Yamaguchi, A., Sakaguchi, H., & Chiji, H. (2015). Dietary polyphenols increase fecal mucin and immunoglobulin A and ameliorate the disturbance in gut microbiota caused by a high fat diet. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 57(3), 212-216. <https://doi.org/10.3164/jcfn.15-15>
- Takahashi, K., Nishida, A., Fujimoto, T., Fujii, M., Shioya, M., Imaeda, H., Inatomi, O., Bamba, S., Sugimoto, M., & Andoh, A. (2016). Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. *Digestion*, 93(1), 59-65. <https://doi.org/10.1159/000441768>
- Takenaka, K., Kitazume, Y., Fujii, T., Tsuchiya, K., Watanabe, M., & Ohtsuka, K. (2020). Objective evaluation for treat to target in Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology*, 55(6), 579-587. <https://doi.org/10.1007/s00535-020-01678-8>
- Tao, R., de Zoeten, E. F., Özkaynak, E., Chen, C., Wang, L., Porrett, P. M., Li, B., Turka, L. A., Olson, E. N., Greene, M. I., Wells, A. D., & Hancock, W. W. (2007). Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nature Medicine*, 13(11), 1299-1307. <https://doi.org/10.1038/nm1652>
- Tarashi, S., Badi, S. A., Moshiri, A., Ebrahimzadeh, N., Fateh, A., Vaziri, F., Aazami, H., Siadat, S. D., & Fuso, A. (2020). The inter-talk between Mycobacterium tuberculosis and the epigenetic mechanisms. *Epigenomics*, 12(5), 455-469. <https://doi.org/10.2217/epi-2019-0187>
- Tarnowski, M., Kopytko, P., & Piotrowska, K. (2021). Epigenetic Regulation of Inflammatory Responses in the Context of Physical Activity. *Genes*, 12(9), 1313. <https://doi.org/10.3390/genes12091313>
- Teimoori-Toolabi, L., Samadpoor, S., Mehtash, A., Ghadir, M., & Vahedi, H. (2018). Among autophagy genes, ATG16L1 but not IRGM is associated with Crohn's disease in Iranians. *Gene*, 675, 176-184. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.06.074>
- Thompson, N. P., Driscoll, R., Pounder, R. E., & Wakefield, A. J. (1996). Genetics versus environment in inflammatory bowel disease : Results of a British twin study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 312(7023), 95-96. <https://doi.org/10.1136/bmj.312.7023.95>



- Thorlacius-Ussing, G., Schnack Nielsen, B., Andersen, V., Holmstrøm, K., & Pedersen, A. E. (2017). Expression and Localization of miR-21 and miR-126 in Mucosal Tissue from Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 23(5), 739-752. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000001086>
- Tlaskalová-Hogenová, H., Tucková, L., Stepánková, R., Hudcovic, T., Palová-Jelínková, L., Kozáková, H., Rossmann, P., Sanchez, D., Cinová, J., Hrnčíř, T., Kverka, M., Frolová, L., Uhlig, H., Powrie, F., & Bland, P. (2005). Involvement of innate immunity in the development of inflammatory and autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1051, 787-798. <https://doi.org/10.1196/annals.1361.122>
- To, N., Gracie, D. J., & Ford, A. C. (2016). Systematic review with meta-analysis : The adverse effects of tobacco smoking on the natural history of Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 43(5), 549-561. <https://doi.org/10.1111/apt.13511>
- Toro, T. B., & Watt, T. J. (2020). Critical Review of Non-Histone Human Substrates of Metal-Dependent Lysine Deacetylases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(10), 13140-13155. <https://doi.org/10.1096/fj.202001301RR>
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F., & Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *The Lancet*, 389(10080), 1741-1755. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31711-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31711-1)
- Travassos, L. H., Carneiro, L. A. M., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.-G., Magalhães, J. G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., Boneca, I. G., Allaoui, A., Jones, N. L., Nuñez, G., Girardin, S. E., & Philpott, D. J. (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nature Immunology*, 11(1), 55-62. <https://doi.org/10.1038/ni.1823>
- Tremolizzo, L., Carboni, G., Ruzicka, W. B., Mitchell, C. P., Sugaya, I., Tueting, P., Sharma, R., Grayson, D. R., Costa, E., & Guidotti, A. (2002). An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), 17095-17100. <https://doi.org/10.1073/pnas.262658999>
- Tsai, S.-C., & Seto, E. (2002). Regulation of histone deacetylase 2 by protein kinase CK2. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 31826-31833. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204149200>
- Tsaprouni, L. G., Ito, K., Powell, J. J., Adcock, I. M., & Pouchard, N. (2011). Differential patterns of histone acetylation in inflammatory bowel diseases. *Journal of Inflammation (London, England)*, 8, 1. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-8-1>
- Tschurtschenthaler, M., Kachroo, P., Heinsen, F.-A., Adolph, T. E., Rühlemann, M. C., Klughammer, J., Offner, F. A., Ammerpohl, O., Krueger, F., Smallwood, S., Szymczak, S., Kaser, A., & Franke, A. (2016). Paternal chronic colitis causes epigenetic inheritance of susceptibility to colitis. *Scientific Reports*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.1038/srep31640>
- Tsianos, V. E., Kostoulas, C., Gazouli, M., Frilingos, S., Georgiou, I., Christodoulou, D. K., Katsanos, K. H., & Tsianos, E. V. (2020). ATG16L1 T300A polymorphism is associated with Crohn's disease in a Northwest Greek cohort, but ECM1 T130M and G290S polymorphisms are not associated with ulcerative colitis. *Annals of Gastroenterology*, 33(1), 38-44. <https://doi.org/10.20524/aog.2019.0434>
- Tsironi, E., Feakins, R. M., Probert, C. S. J., Roberts, C. S. J., Rampton, D. S., & Phil, D. (2004). Incidence of inflammatory bowel disease is rising and abdominal tuberculosis is falling in Bangladeshis in East London, United Kingdom. *The American Journal of Gastroenterology*, 99(9), 1749-1755. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2004.30445.x>
- Tsui, J. J., & Huynh, H. Q. (2018). Is top-down therapy a more effective alternative to conventional step-up therapy for Crohn's disease? *Annals of Gastroenterology*, 31(4), 413-424. <https://doi.org/10.20524/aog.2018.0253>



- Turgeon, N., Blais, M., Gagné, J.-M., Tardif, V., Boudreau, F., Perreault, N., & Asselin, C. (2013). HDAC1 and HDAC2 Restrain the Intestinal Inflammatory Response by Regulating Intestinal Epithelial Cell Differentiation. *PLoS ONE*, *8*(9), e73785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073785>
- Turgeon, N., Gagné, J. M., Blais, M., Gendron, F.-P., Boudreau, F., & Asselin, C. (2014). The acetylome regulators Hdac1 and Hdac2 differently modulate intestinal epithelial cell dependent homeostatic responses in experimental colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *306*(7), G594-G605. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00393.2013>
- Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009). The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome : A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Science translational medicine*, *1*(6), 6ra14. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000322>
- Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, *9*(11), 799-809. <https://doi.org/10.1038/nri2653>
- Turner, K., Genta, R. M., Lujan, G., Robiou, C., & Sonnenberg, A. (2014). Significance of the Epithelioid Granuloma in Biopsies of Crohn's Colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, *20*(12), 2271-2275. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000196>
- Turpin, W., Lee, S.-H., Raygoza Garay, J. A., Madsen, K. L., Meddings, J. B., Bedrani, L., Power, N., Espin-Garcia, O., Xu, W., Smith, M. I., Griffiths, A. M., Moayyedi, P., Turner, D., Seidman, E. G., Steinhart, A. H., Marshall, J. K., Jacobson, K., Mack, D., Huynh, H., ... Croitoru, K. (2020). Increased Intestinal Permeability Is Associated With Later Development of Crohn's Disease. *Gastroenterology*, *159*(6), 2092-2100.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.08.005>
- Uhlig, H. H., & Powrie, F. (2018). Translating Immunology into Therapeutic Concepts for Inflammatory Bowel Disease. *Annual Review of Immunology*, *36*, 755-781. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053055>
- Ungaro, F., Massimino, L., Furfaro, F., Rimoldi, V., Peyrin-Biroulet, L., D'Alessio, S., & Danese, S. (2018). Metagenomic analysis of intestinal mucosa revealed a specific eukaryotic gut virome signature in early-diagnosed inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*, *10*(2), 149-158. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1511664>
- Ungaro, R., Bernstein, C. N., Geary, R., Hviid, A., Kolho, K.-L., Kronman, M. P., Shaw, S., Van Kruiningen, H., Colombel, J.-F., & Atreja, A. (2014). Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: A meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology*, *109*(11), 1728-1738. <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.246>
- Ungerstedt, J. S., Sowa, Y., Xu, W.-S., Shao, Y., Dokmanovic, M., Perez, G., Ngo, L., Holmgren, A., Jiang, X., & Marks, P. A. (2005). Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(3), 673-678. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408732102>
- VanDussen, K. L., Liu, T.-C., Li, D., Towfic, F., Modiano, N., Winter, R., Haritunians, T., Taylor, K. D., Dhall, D., Targan, S. R., Xavier, R. J., McGovern, D. P. B., & Stappenbeck, T. S. (2014). Genetic Variants Synthesize to Produce Paneth Cell Phenotypes that Define Subtypes of Crohn's Disease. *Gastroenterology*, *146*(1), 200-209. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.09.048>
- van Enkhuizen, J., Geyer, M. A., Kooistra, K., & Young, J. W. (2013). Chronic valproate attenuates some, but not all, facets of mania-like behavior in mice. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, *16*(5), 1021-1031. <https://doi.org/10.1017/S1461145712001198>
- Vangay, P., Johnson, A. J., Ward, T. L., Al-Ghalith, G. A., Shields-Cutler, R. R., Hillmann, B. M., Lucas, S. K., Beura, L. K., Thompson, E. A., Till, L. M., Batres, R., Paw, B., Pergament, S. L., Saenyakul, P., Xiong, M., Kim, A. D., Kim, G., Masopust, D., Martens, E. C., ... Knights, D. (2018). U.S. immigration westernizes the human gut microbiome. *Cell*, *175*(4), 962-972.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.029>

- van Langenberg, D. R., Papandony, M. C., & Gibson, P. R. (2015). Sleep and physical activity measured by accelerometry in Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *41*(10), 991-1004. <https://doi.org/10.1111/apt.13160>
- Vavricka, S. R., Brun, L., Ballabeni, P., Pittet, V., Prinz Vavricka, B. M., Zeitz, J., Rogler, G., & Schoepfer, A. M. (2011). Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the Swiss inflammatory bowel disease cohort. *The American Journal of Gastroenterology*, *106*(1), 110-119. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.343>
- Vazeille, E., Buisson, A., Bringer, M.-A., Goutte, M., Ouchchane, L., Hugot, J.-P., de Vallée, A., Barnich, N., Bommelaer, G., & Darfeuille-Michaud, A. (2015). Monocyte-derived macrophages from Crohn's disease patients are impaired in the ability to control intracellular adherent-invasive *Escherichia coli* and exhibit disordered cytokine secretion profile. *Journal of Crohn's & Colitis*, *9*(5), 410-420. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv053>
- Vaziri, H., Dessain, S. K., Ng Eaton, E., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K., Guarente, L., & Weinberg, R. A. (2001). HSI2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, *107*(2), 149-159. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00527-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00527-x)
- Ventham, N. T., Kennedy, N. A., Adams, A. T., Kalla, R., Heath, S., O'Leary, K. R., Drummond, H., Wilson, D. C., Gut, I. G., Nimmo, E. R., & Satsangi, J. (2016). Integrative epigenome-wide analysis demonstrates that DNA methylation may mediate genetic risk in inflammatory bowel disease. *Nature Communications*, *7*, 13507. <https://doi.org/10.1038/ncomms13507>
- Vermeire, S., Joossens, S., Peeters, M., Monsuur, F., Marien, G., Bossuyt, X., Groenen, P., Vlietinck, R., & Rutgeerts, P. (2001). Comparative study of ASCA (Anti-Saccharomyces cerevisiae antibody) assays in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, *120*(4), 827-833. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.22546>
- Vermeulen, M., Carrozza, M. J., Lasonder, E., Workman, J. L., Logie, C., & Stunnenberg, H. G. (2004). In Vitro Targeting Reveals Intrinsic Histone Tail Specificity of the Sin3/Histone Deacetylase and N-CoR/SMRT Corepressor Complexes. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(6), 2364-2372. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.6.2364-2372.2004>
- Vernia, F., Ruscio, M. D., Stefanelli, G., Viscido, A., Frieri, G., & Latella, G. (2020). Is fecal calprotectin an accurate marker in the management of Crohn's disease? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *35*(3), 390-400. <https://doi.org/10.1111/jgh.14950>
- Verschuere, S., Bracke, K. R., Demoor, T., Plantinga, M., Verbrugghe, P., Ferdinande, L., Lambrecht, B. N., Brusselle, G. G. G., & Cuvelier, C. A. (2011). Cigarette smoking alters epithelial apoptosis and immune composition in murine GALT. *Laboratory Investigation*, *91*(7), 7. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.74>
- Vetrano, S., Rescigno, M., Cera, M. R., Correale, C., Rumio, C., Doni, A., Fantini, M., Sturm, A., Borroni, E., Repici, A., Locati, M., Malesci, A., Dejana, E., & Danese, S. (2008). Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, *135*(1), 173-184. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.04.002>
- Viennois, E., Bretin, A., Dubé, P. E., Maue, A. C., Dauriat, C. J. G., Barnich, N., Gewirtz, A. T., & Chassaing, B. (2020). Dietary Emulsifiers Directly Impact Adherent-Invasive *E. coli* Gene Expression to Drive Chronic Intestinal Inflammation. *Cell Reports*, *33*(1), 108229. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108229>
- Viennois, E., & Chassaing, B. (2018). First victim, later aggressor: How the intestinal microbiota drives the pro-inflammatory effects of dietary emulsifiers? *Gut Microbes*, 1-4. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1421885>
- Vieujean, S., Caron, B., Haghnejad, V., Jouzeau, J.-Y., Netter, P., Heba, A.-C., Ndiaye, N. C., Moulin, D., Barreto, G., Danese, S., & Peyrin-Biroulet, L. (2022). Impact of the Exposome on the Epigenome in Inflammatory Bowel Disease Patients and Animal Models. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(14), 7611. <https://doi.org/10.3390/ijms23147611>
- Vivinus-Nébot, M., Frin-Mathy, G., Bziouche, H., Dainese, R., Bernard, G., Anty, R., Filippi, J., Saint-Paul, M. C., Tulic, M. K., Verhasselt, V., Hébuterne, X., & Piche, T. (2014). Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory

- bowel diseases: Role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut*, 63(5), 744-752. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-304066>
- Volmar, C.-H., & Wahlestedt, C. (2015). Histone deacetylases (HDACs) and brain function. *Neuroepigenetics*, 1, 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.nepig.2014.10.002>
- von Burstin, J., Eser, S., Paul, M. C., Seidler, B., Brandl, M., Messer, M., von Werder, A., Schmidt, A., Mages, J., Pagel, P., Schnieke, A., Schmid, R. M., Schneider, G., & Saur, D. (2009). E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. *Gastroenterology*, 137(1), 361-371, 371.e1-5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.04.004>
- Vrijens, K., Bollati, V., & Nawrot, T. S. (2015). MicroRNAs as Potential Signatures of Environmental Exposure or Effect: A Systematic Review. *Environmental Health Perspectives*, 123(5), 399-411. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408459>
- Vujkovic-Cvijin, I., Welles, H. C., Ha, C. W. Y., Huq, L., Mistry, S., Brenchley, J. M., Trinchieri, G., Devkota, S., & Belkaid, Y. (2022). The systemic anti-microbiota IgG repertoire can identify gut bacteria that translocate across gut barrier surfaces. *Science Translational Medicine*, 14(658), eabl3927. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abl3927>
- Wagner, J., Maksimovic, J., Farries, G., Sim, W. H., Bishop, R. F., Cameron, D. J., Catto-Smith, A. G., & Kirkwood, C. D. (2013). Bacteriophages in Gut Samples From Pediatric Crohn's Disease Patients: Metagenomic Analysis Using 454 Pyrosequencing. *Inflammatory Bowel Diseases*, 19(8), 1598-1608. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e318292477c>
- Walker, A. W., Sanderson, J. D., Churcher, C., Parkes, G. C., Hudspith, B. N., Rayment, N., Brostoff, J., Parkhill, J., Dougan, G., & Petrovska, L. (2011). High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiology*, 11, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-7>
- Wan, E. S., Qiu, W., Baccarelli, A., Carey, V. J., Bacherman, H., Rennard, S. I., Agusti, A., Anderson, W., Lomas, D. A., & Demeo, D. L. (2012). Cigarette smoking behaviors and time since quitting are associated with differential DNA methylation across the human genome. *Human Molecular Genetics*, 21(13), 3073-3082. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds135>
- Wang, G., Wang, R., Strulovici-Barel, Y., Salit, J., Staudt, M. R., Ahmed, J., Tilley, A. E., Yee-Levin, J., Hollmann, C., Harvey, B.-G., Kaner, R. J., Mezey, J. G., Sridhar, S., Pillai, S. G., Hilton, H., Wolff, G., Bitter, H., Visvanathan, S., Fine, J. S., ... Crystal, R. G. (2015). Persistence of smoking-induced dysregulation of miRNA expression in the small airway epithelium despite smoking cessation. *PloS One*, 10(4), e0120824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120824>
- Wang, H., Chao, K., Ng, S. C., Bai, A. H., Yu, Q., Yu, J., Li, M., Cui, Y., Chen, M., Hu, J.-F., & Zhang, S. (2016). Pro-inflammatory miR-223 mediates the cross-talk between the IL23 pathway and the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Genome Biology*, 17, 58. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0901-8>
- Wang, H., Zhang, S., Yu, Q., Yang, G., Guo, J., Li, M., Zeng, Z., He, Y., Chen, B., & Chen, M. (2016). Circulating MicroRNA223 is a New Biomarker for Inflammatory Bowel Disease. *Medicine*, 95(5), e2703. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002703>
- Wang, H.-B., Wang, P.-Y., Wang, X., Wan, Y.-L., & Liu, Y.-C. (2012). Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription. *Digestive Diseases and Sciences*, 57(12), 3126-3135. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2259-4>
- Wang, J., Xu, M.-Q., Jiang, X.-L., Mei, X.-Y., & Liu, X.-G. (2018). Histone deacetylase inhibitor SAHA-induced epithelial-mesenchymal transition by upregulating Slug in lung cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*, 29(1), 80-88. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000573>
- Wang, J., Yan, X., Nesengani, L. T., Ding, H., Yang, L., & Lu, W. (2018). LPS-induces IL-6 and IL-8 gene expression in bovine endometrial cells "through DNA methylation". *Gene*, 677, 266-272. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.07.074>

- Wang, S., Hou, Y., Chen, W., Wang, J., Xie, W., Zhang, X., & Zeng, L. (2018). KIF9-AS1, LINC01272 and DIO3OS lncRNAs as novel biomarkers for inflammatory bowel disease. *Molecular Medicine Reports*, 17(2), 2195-2202. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8118>
- Wang, S.-L., WANG, Z.-R., & YANG, C.-Q. (2012). Meta-analysis of broad-spectrum antibiotic therapy in patients with active inflammatory bowel disease. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 4(6), 1051-1056. <https://doi.org/10.3892/etm.2012.718>
- Wang, X., Wu, Y., Jiao, J., & Huang, Q. (2018). Mycobacterium tuberculosis infection induces IL-10 gene expression by disturbing histone deacetylase 6 and histone deacetylase 11 equilibrium in macrophages. *Tuberculosis*, 108, 118-123. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.11.008>
- Wang, Y., Curry, H. M., Zwilling, B. S., & Lafuse, W. P. (2005). Mycobacteria Inhibition of IFN- $\gamma$  Induced HLA-DR Gene Expression by Up-Regulating Histone Deacetylation at the Promoter Region in Human THP-1 Monocytic Cells. *The Journal of Immunology*, 174(9), 5687-5694. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5687>
- Wang, Y., Ma, L., Zhang, W., Cui, X., Wang, H., & Xu, B. (2016). Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 47(1), 48-56. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0374-x>
- Wang, Y.-L., Faiola, F., Xu, M., Pan, S., & Martinez, E. (2008). Human ATAC Is a GCN5/PCAF-containing acetylase complex with a novel NC2-like histone fold module that interacts with the TATA-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(49), 33808-33815. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806936200>
- Wapenaar, H., & Dekker, F. J. (2016). Histone acetyltransferases : Challenges in targeting bi-substrate enzymes. *Clinical Epigenetics*, 8(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0225-2>
- Warnault, V., Darcq, E., Levine, A., Barak, S., & Ron, D. (2013). Chromatin remodeling—A novel strategy to control excessive alcohol drinking. *Translational Psychiatry*, 3(2), 2. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.4>
- Watanabe, T., Asano, N., Murray, P. J., Ozato, K., Tailor, P., Fuss, I. J., Kitani, A., & Strober, W. (2008). Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 545-559. <https://doi.org/10.1172/JCI33145>
- Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P. J., & Strober, W. (2004). NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nature Immunology*, 5(8), 800-808. <https://doi.org/10.1038/ni1092>
- Waterland, R. A., Kellermayer, R., Laritsky, E., Rayco-Solon, P., Harris, R. A., Travisano, M., Zhang, W., Torskaya, M. S., Zhang, J., Shen, L., Manary, M. J., & Prentice, A. M. (2010). Season of Conception in Rural Gambia Affects DNA Methylation at Putative Human Metastable Epialleles. *PLoS Genetics*, 6(12), e1001252. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001252>
- Watson, P. J., Fairall, L., Santos, G. M., & Schwabe, J. W. R. (2012). Structure of HDAC3 bound to corepressor and inositol tetrakisphosphate. *Nature*, 481(7381), 335-340. <https://doi.org/10.1038/nature10728>
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schäffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K. R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., Schröder, J. M., Bevins, C. L., Fellermann, K., & Stange, E. F. (2004). NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*, 53(11), 1658-1664. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.032805>
- Wehkamp, J., Salzman, N. H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R. E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., Feathers, R. W., Chu, H., Lima, H., Fellermann, K., Ganz, T., Stange, E. F., & Bevins, C. L. (2005). Reduced Paneth cell  $\alpha$ -defensins in ileal Crohn's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 18129-18134. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505256102>
- Wei, M., Gao, X., Liu, L., Li, Z., Wan, Z., Dong, Y., Chen, X., Niu, Y., Zhang, J., & Yang, G. (2020). Visceral Adipose Tissue Derived Exosomes Exacerbate Colitis Severity via Pro-inflammatory MiRNAs in High Fat Diet Fed Mice. *ACS Nano*, 14(4), 5099-5110. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c01860>



- Weichert, W., Denkert, C., Noske, A., Darb-Esfahani, S., Dietel, M., Kalloger, S. E., Huntsman, D. G., & Köbel, M. (2008). Expression of Class I Histone Deacetylases Indicates Poor Prognosis in Endometrioid Subtypes of Ovarian and Endometrial Carcinomas. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *10*(9), 1021-1027.
- Weichert, W., Röske, A., Gekeler, V., Beckers, T., Ebert, M. P. A., Pross, M., Dietel, M., Denkert, C., & Röcken, C. (2008). Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: A retrospective analysis. *The Lancet. Oncology*, *9*(2), 139-148. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70004-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70004-4)
- Weichert, W., Röske, A., Gekeler, V., Beckers, T., Stephan, C., Jung, K., Fritzsche, F. R., Niesporek, S., Denkert, C., Dietel, M., & Kristiansen, G. (2008). Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. *British Journal of Cancer*, *98*(3), 604-610. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604199>
- Weichert, W., Röske, A., Niesporek, S., Noske, A., Buckendahl, A.-C., Dietel, M., Gekeler, V., Boehm, M., Beckers, T., & Denkert, C. (2008). Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: Specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *14*(6), 1669-1677. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0990>
- Weinberg, D. N., Papillon-Cavanagh, S., Chen, H., Yue, Y., Chen, X., Rajagopalan, K. N., Horth, C., McGuire, J. T., Xu, X., Nikbakht, H., Lemiesz, A. E., Marchione, D. M., Marunde, M. R., Meiners, M. J., Cheek, M. A., Keogh, M.-C., Bareke, E., Djedid, A., Harutyunyan, A. S., ... Lu, C. (2019). The histone mark H3K36me2 recruits DNMT3A and shapes the intergenic DNA methylation landscape. *Nature*, *573*(7773), 7773. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1534-3>
- Wen, Y.-D., Perissi, V., Staszewski, L. M., Yang, W.-M., Krones, A., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., & Seto, E. (2000). The histone deacetylase-3 complex contains nuclear receptor corepressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(13), 7202-7207.
- Willinger, C. M., Rong, J., Tanriverdi, K., Courchesne, P. L., Huan, T., Wasserman, G. A., Lin, H., Dupuis, J., Joehanes, R., Jones, M. R., Chen, G., Benjamin, E. J., O'Connor, G. T., Mizgerd, J. P., Freedman, J. E., Larson, M. G., & Levy, D. (2017). A MicroRNA Signature of Cigarette Smoking and Evidence for a Putative Causal Role of MicroRNAs in Smoking-Related Inflammation and Target Organ Damage. *Circulation. Cardiovascular genetics*, *10*(5), e001678. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.116.001678>
- Wilson, R., Wahl, S., Pfeiffer, L., Ward-Caviness, C. K., Kunze, S., Kretschmer, A., Reischl, E., Peters, A., Gieger, C., & Waldenberger, M. (2017). The dynamics of smoking-related disturbed methylation: A two time-point study of methylation change in smokers, non-smokers and former smokers. *BMC Genomics*, *18*(1), 805. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4198-0>
- Wine, E., Ossa, J. C., Gray-Owen, S. D., & Sherman, P. M. (2009). Adherent-invasive Escherichia coli, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia. *BMC Microbiology*, *9*, 180. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-180>
- Wojciechowski, M., Lowe, R., Maleszka, J., Conn, D., Maleszka, R., & Hurd, P. J. (2018). Phenotypically distinct female castes in honey bees are defined by alternative chromatin states during larval development. *Genome Research*, *28*(10), 1532-1542. <https://doi.org/10.1101/gr.236497.118>
- Wolff, G. L., Kodell, R. L., Moore, S. R., & Cooney, C. A. (1998). Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *12*(11), 949-957.
- Woo, H. D., Fernandez-Jimenez, N., Ghantous, A., Degli Esposti, D., Cuenin, C., Cahais, V., Choi, I. J., Kim, Y.-I., Kim, J., & Herceg, Z. (2018). Genome-wide profiling of normal gastric mucosa identifies Helicobacter pylori- and cancer-associated DNA methylome changes. *International Journal of Cancer*, *143*(3), 597-609. <https://doi.org/10.1002/ijc.31381>



- Woo, V., Eshleman, E. M., Rice, T., Whitt, J., Vallance, B. A., & Alenghat, T. (2019). Microbiota Inhibit Epithelial Pathogen Adherence by Epigenetically Regulating C-Type Lectin Expression. *Frontiers in Immunology*, *10*, 928. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00928>
- Wright, E. K., Kamm, M. A., Teo, S. M., Inouye, M., Wagner, J., & Kirkwood, C. D. (2015). Recent Advances in Characterizing the Gastrointestinal Microbiome in Crohn's Disease: A Systematic Review. *Inflammatory Bowel Diseases*, *21*(6), 1219-1228. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000382>
- Wu, F., Guo, N. J., Tian, H., Marohn, M., Gearhart, S., Bayless, T. M., Brant, S. R., & Kwon, J. H. (2011). Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *17*(1), 241-250. <https://doi.org/10.1002/ibd.21450>
- Wu, F., Zhang, S., Dassopoulos, T., Harris, M. L., Bayless, T. M., Meltzer, S. J., Brant, S. R., & Kwon, J. H. (2010). Identification of microRNAs associated with ileal and colonic Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *16*(10), 1729-1738. <https://doi.org/10.1002/ibd.21267>
- Wu, J., Zhao, Y., Wang, X., Kong, L., Johnston, L. J., Lu, L., & Ma, X. (2022). Dietary nutrients shape gut microbes and intestinal mucosa via epigenetic modifications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *62*(3), 783-797. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1828813>
- Wu, L., Zhang, Y., & Ren, J. (2021). Epigenetic modification in alcohol use disorder and alcoholic cardiomyopathy: From pathophysiology to therapeutic opportunities. *Metabolism*, *125*, 154909. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2021.154909>
- Wu, S., Hashimoto-Hill, S., Woo, V., Eshleman, E. M., Whitt, J., Engleman, L., Karns, R., Denson, L. A., Haslam, D. B., & Alenghat, T. (2020). Microbiota-derived metabolite promotes HDAC3 activity in the gut. *Nature*, *586*(7827), 7827. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2604-2>
- Wu, X., & Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond. *Nature Reviews Genetics*, *18*(9), 517-534. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>
- Wyatt, J., Oberhuber, G., Pongratz, S., Püspök, A., Moser, G., Novacek, G., Lochs, H., & Vogelsang, H. (1997). Increased gastric and intestinal permeability in patients with Crohn's disease. *The American Journal of Gastroenterology*, *92*(10), 1891-1896.
- Wyatt, J., Vogelsang, H., Hübl, W., Waldhöer, T., & Lochs, H. (1993). Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet (London, England)*, *341*(8858), 1437-1439. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90882-h](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90882-h)
- Wymore Brand, M., Wannemuehler, M. J., Phillips, G. J., Proctor, A., Overstreet, A.-M., Jergens, A. E., Orcutt, R. P., & Fox, J. G. (2015). The Altered Schaedler Flora: Continued Applications of a Defined Murine Microbial Community. *ILAR Journal*, *56*(2), 169-178. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilv012>
- Xu, Z., Schaedel, L., Portran, D., Aguilar, A., Gaillard, J., Marinkovich, M. P., Théry, M., & Nachury, M. V. (2017). Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intralumenal acetylation. *Science (New York, N.Y.)*, *356*(6335), 328-332. <https://doi.org/10.1126/science.aai8764>
- Xue, L.-N., Xu, K.-Q., Zhang, W., Wang, Q., Wu, J., & Wang, X.-Y. (2013). Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease: A meta-analysis. *Inflammatory Bowel Diseases*, *19*(1), 54-60. <https://doi.org/10.1002/ibd.22966>
- Xue, X., Cao, A. T., Cao, X., Yao, S., Carlsen, E. D., Soong, L., Liu, C.-G., Liu, X., Liu, Z., Duck, L. W., Elson, C. O., & Cong, Y. (2014). Downregulation of microRNA-107 in intestinal CD11c(+) myeloid cells in response to microbiota and proinflammatory cytokines increases IL-23p19 expression. *European Journal of Immunology*, *44*(3), 673-682. <https://doi.org/10.1002/eji.201343717>

- Xue, X., Feng, T., Yao, S., Wolf, K. J., Liu, C.-G., Liu, X., Elson, C. O., & Cong, Y. (2011). Microbiotadown regulates dendritic cell expression of miR-10a which targets IL-12/IL-23p40. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(11), 5879-5886. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100535>
- Yakut, M., Ustün, Y., Kabaçam, G., & Soykan, I. (2010). Serum vitamin B12 and folate status in patients with inflammatory bowel diseases. *European Journal of Internal Medicine*, 21(4), 320-323. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2010.05.007>
- Yamaguchi, T., Cubizolles, F., Zhang, Y., Reichert, N., Kohler, H., Seiser, C., & Matthias, P. (2010). Histone deacetylases 1 and 2 act in concert to promote the G1-to-S progression. *Genes & Development*, 24(5), 455-469. <https://doi.org/10.1101/gad.552310>
- Yan, J., Zhang, M., Zhang, J., Chen, X., & Zhang, X. (2011). Helicobacter pylori infection promotes methylation of WWOX gene in human gastric cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 408(1), 99-102. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.127>
- Yang, L., Chen, S., Xia, J., Zhou, Y., Peng, L., Fan, H., Han, Y., Duan, L., Cheng, G., Yang, H., & Xu, F. (2022). Histone deacetylase 3 facilitates TNF $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation through suppressing CTSSB induced RIP1 degradation and is required for host defense against bacterial infection. *Cell & Bioscience*, 12(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00814-6>
- Yang, Q., Li, W., She, H., Dou, J., Duong, D. M., Du, Y., Yang, S.-H., Seyfried, N. T., Fu, H., Gao, G., & Mao, Z. (2015). Stress Induces p38 MAPK-mediated Phosphorylation and Inhibition of Drosha-dependent Cell Survival. *Molecular cell*, 57(4), 721-734. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.004>
- Yarani, R., Mirza, A. H., Kaur, S., & Pociot, F. (2018). The emerging role of lncRNAs in inflammatory bowel disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(12), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0188-9>
- Yaseen, I., Kaur, P., Nandicoori, V. K., & Khosla, S. (2015). Mycobacteria modulate host epigenetic machinery by Rv1988 methylation of a non-tail arginine of histone H3. *Nature Communications*, 6, 8922. <https://doi.org/10.1038/ncomms9922>
- Yatsunyk, L. A., Easton, J. A., Kim, L. R., Sugarbaker, S. A., Bennett, B., Breece, R. M., Vorontsov, I. I., Tierney, D. L., Crowder, M. W., & Rosenzweig, A. C. (2008). Structure and metal binding properties of ZnuA, a periplasmic zinc transporter from Escherichia coli. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 13(2), 271-288. <https://doi.org/10.1007/s00775-007-0320-0>
- Yoo, Y.-G., Kong, G., & Lee, M.-O. (2006). Metastasis-associated protein 1 enhances stability of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein by recruiting histone deacetylase 1. *The EMBO Journal*, 25(6), 1231-1241. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601025>
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., & Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(28), 17174-17179.
- Zamani, S., Zali, M. R., Aghdaei, H. A., Sechi, L. A., Niegowska, M., Caggiu, E., Keshavarz, R., Mosavari, N., & Feizabadi, M. M. (2017). Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis and associated risk factors for inflammatory bowel disease in Iranian patients. *Gut Pathogens*, 9(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0151-z>
- Zarei-Kordshouli, F., Geramizadeh, B., & Khodakaram-Tafti, A. (2019). Prevalence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis IS 900 DNA in biopsy tissues from patients with Crohn's disease : Histopathological and molecular comparison with Johne's disease in Fars province of Iran. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3619-2>
- Zeissig, S., Bojarski, C., Buergel, N., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M., & Schulzke, J. D. (2004). Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor  $\alpha$  antibody treatment. *Gut*, 53(9), 1295-1302. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.036632>

- Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A. J., Zeitz, M., Fromm, M., & Schulzke, J. (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*, *56*(1), 61-72. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.094375>
- Zeng, L., Zhang, Q., Li, S., Plotnikov, A. N., Walsh, M. J., & Zhou, M.-M. (2010). Mechanism and Regulation of Acetylated Histone Binding by the Tandem PHD Finger of DPF3b. *Nature*, *466*(7303), 258-262. <https://doi.org/10.1038/nature09139>
- Zhang, B., Zhang, X., Jin, M., Hu, L., Zang, M., Qiu, W., Wang, S., Liu, B., Liu, S., & Guo, D. (2019). CagA increases DNA methylation and decreases PTEN expression in human gastric cancer. *Molecular Medicine Reports*, *19*(1), 309-319. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9654>
- Zhang, D., Tang, Z., Huang, H., Zhou, G., Cui, C., Weng, Y., Liu, W., Kim, S., Lee, S., Perez-Neut, M., Ding, J., Czyz, D., Hu, R., Ye, Z., He, M., Zheng, Y. G., Shuman, H. A., Dai, L., Ren, B., ... Zhao, Y. (2019). Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature*, *574*(7779), 7779. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1678-1>
- Zhang, J., & Zhong, Q. (2014). Histone deacetylase inhibitors and cell death. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *71*(20), 3885-3901. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1656-6>
- Zhang, L., Deng, M., Lu, A., Chen, Y., Chen, Y., Wu, C., Tan, Z., Boini, K. M., Yang, T., Zhu, Q., & Wang, L. (2019). Sodium butyrate attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy by inhibiting COX2/PGE2 pathway via a HDAC5/HDAC6-dependent mechanism. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *23*(12), 8139-8150. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14684>
- Zhang, M., Yang, D., Yu, H., & Li, Q. (2021). MicroRNA-497 inhibits inflammation in DSS-induced IBD model mice and lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *International Immunopharmacology*, *101*(Pt B), 108318. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108318>
- Zhang, P., Chu, T., Dedousis, N., Mantell, B. S., Sipula, I., Li, L., Bunce, K. D., Shaw, P. A., Katz, L. S., Zhu, J., Argmann, C., O'Doherty, R. M., Peters, D. G., & Scott, D. K. (2017). DNA methylation alters transcriptional rates of differentially expressed genes and contributes to pathophysiology in mice fed a high fat diet. *Molecular Metabolism*, *6*(4), 327-339. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.02.001>
- Zhang, Q., Xiao, X., Zheng, J., Li, M., Yu, M., Ping, F., Wang, T., & Wang, X. (2019). A Maternal High-Fat Diet Induces DNA Methylation Changes That Contribute to Glucose Intolerance in Offspring. *Frontiers in Endocrinology*, *10*, 871. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00871>
- Zhang, S., Morgan, X., Dogan, B., Martin, F.-P., Strickler, S., Oka, A., Herzog, J., Liu, B., Dowd, S. E., Huttenhower, C., Pichaud, M., Dogan, E. I., Satsangi, J., Longman, R., Yantiss, R., Mueller, L. A., Scherl, E. J., Sartor, R. B., & Simpson, K. W. (2022). Mucosal metabolites fuel the growth and virulence of *E. coli* linked to Crohn's disease. *JCI Insight*, *7*(10), e157013. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.157013>
- Zhang, X., Ozawa, Y., Lee, H., Wen, Y.-D., Tan, T.-H., Wadzinski, B. E., & Seto, E. (2005). Histone deacetylase 3 (HDAC3) activity is regulated by interaction with protein serine/threonine phosphatase 4. *Genes & Development*, *19*(7), 827-839. <https://doi.org/10.1101/gad.1286005>
- Zhang, X., Wharton, W., Yuan, Z., Tsai, S.-C., Olashaw, N., & Seto, E. (2004). Activation of the Growth-Differentiation Factor 11 Gene by the Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor Trichostatin A and Repression by HDAC3. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(12), 5106-5118. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.12.5106-5118.2004>
- Zhang, Y., Andrade, R., Hanna, A. A., & Pflum, M. K. H. (2022). Evidence that HDAC7 acts as an epigenetic "reader" of AR acetylation through NCoR-HDAC3 dissociation. *Cell Chemical Biology*, *29*(7), 1162-1173.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2022.05.008>

- Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S., & Matthias, P. (2003). HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *The EMBO Journal*, 22(5), 1168-1179. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg115>
- Zhang, Y., Zhang, X., Park, J., Kim, J., Zhang, L., Ma, J., Liu, W., Deng, D., You, W., Kim, Y., & Pan, K. (2016). Genome-wide DNA methylation profiles altered by *Helicobacter pylori* in gastric mucosa and blood leukocyte DNA. *Oncotarget*, 7(24), 37132-37144. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9469>
- Zhang, Z., Wang, M., Zhang, Y., Zhang, Y., Bartkuhn, M., Markmann, M., Hossain, H., Chakraborty, T., Hake, S. B., Jia, Z., Meinhardt, A., & Bhushan, S. (2021). Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factor  $\alpha$ -Hemolysin Reduces Histone Acetylation to Inhibit Expression of Proinflammatory Cytokine Genes. *The Journal of Infectious Diseases*, 223(6), 1040-1051. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab018>
- Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hara, Y., Kobayashi, S., & Iwase, H. (2005). Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast\*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 94(1), 11-16. <https://doi.org/10.1007/s10549-005-6001-1>
- Zhang, Z., Zhang, H., Chen, T., Shi, L., Wang, D., & Tang, D. (2022). Regulatory role of short-chain fatty acids in inflammatory bowel disease. *Cell Communication and Signaling*, 20(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00869-5>
- Zhang, Z., Zhang, Z.-Y., Wu, Y., & Schluesener, H. J. (2012). Valproic acid ameliorates inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis rats. *Neuroscience*, 221, 140-150. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.013>
- Zhao, H., Zhao, C., Dong, Y., Zhang, M., Wang, Y., Li, F., Li, X., McClain, C., Yang, S., & Feng, W. (2015). Inhibition of miR122a by *Lactobacillus rhamnosus* GG culture supernatant increases intestinal occludin expression and protects mice from alcoholic liver disease. *Toxicology Letters*, 234(3), 194-200. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.03.002>
- Zhao, R., Nakamura, T., Fu, Y., Lazar, Z., & Spector, D. L. (2011). Gene bookmarking accelerates the kinetics of post-mitotic transcriptional re-activation. *Nature cell biology*, 13(11), 1295-1304. <https://doi.org/10.1038/ncb2341>
- Zhao, Y., Lu, S., Wu, L., Chai, G., Wang, H., Chen, Y., Sun, J., Yu, Y., Zhou, W., Zheng, Q., Wu, M., Otterson, G. A., & Zhu, W.-G. (2006). Acetylation of p53 at Lysine 373/382 by the Histone Deacetylase Inhibitor Depsipeptide Induces Expression of p21Waf1/Cip1. *Molecular and Cellular Biology*, 26(7), 2782-2790. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.7.2782-2790.2006>
- Zheng, L., Kelly, C. J., Battista, K. D., Schaefer, R., Lanis, J. M., Alexeev, E. E., Wang, R. X., Onyiah, J. C., Kominsky, D. J., & Colgan, S. P. (2017). Microbial-derived Butyrate Promotes Epithelial Barrier Function Through IL-10 Receptor-dependent Repression of Claudin-2. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 199(8), 2976-2984. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700105>
- Zheng, L., Leung, E. T. Y., Wong, H. K., Lui, G., Lee, N., To, K.-F., Choy, K. W., Chan, R. C. Y., & Ip, M. (2016). Unraveling methylation changes of host macrophages in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis*, 98, 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.03.003>
- Zhernakova, A., Festen, E. M., Franke, L., Trynka, G., van Diemen, C. C., Monsuur, A. J., Bevova, M., Nijmeijer, R. M., van 't Slot, R., Heijmans, R., Boezen, H. M., van Heel, D. A., van Bodegraven, A. A., Stokkers, P. C. F., Wijmenga, C., Crusius, J. B. A., & Weersma, R. K. (2008). Genetic Analysis of Innate Immunity in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis Identifies Two Susceptibility Loci Harboring CARD9 and IL18RAP. *American Journal of Human Genetics*, 82(5), 1202-1210. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.03.016>
- Zhilu, X., Xiangqian, D., Keli, Y., Caroline, C., Jingwan, Z., Yu, L., Tao, Z., Cheung, C. L., Yang, S., Fengrui, Z., Kl, C. F., Jy, S. J., Jun, Y., Anthony, B., Nicolas, B., Jean-Frédéric, C., Sunny Hei, W., Yinglei, M., & Siew C, N. (2021). Association of Adherent-invasive *Escherichia coli* with severe Gut Mucosal dysbiosis in Hong Kong Chinese population with Crohn's disease. *Gut Microbes*, 13(1), 1994833. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1994833>

- Zhou, V. W., Goren, A., & Bernstein, B. E. (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature Reviews Genetics*, *12*(1), 7-18. <https://doi.org/10.1038/nrg2905>
- Zhu, K., Liu, M., Fu, Z., Zhou, Z., Kong, Y., Liang, H., Lin, Z., Luo, J., Zheng, H., Wan, P., Zhang, J., Zen, K., Chen, J., Hu, F., Zhang, C.-Y., Ren, J., & Chen, X. (2017). Plant microRNAs in larval food regulate honeybee caste development. *PLoS Genetics*, *13*(8), e1006946. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006946>
- Ziemka-Nalecz, M., Jaworska, J., Sypecka, J., & Zalewska, T. (2018). Histone Deacetylase Inhibitors : A Therapeutic Key in Neurological Disorders? *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *77*(10), 855-870. <https://doi.org/10.1093/jnen/nly073>
- Zimberlin, C. D., Lancini, C., Sno, R., Rosekrans, S. L., McLean, C. M., Vlaming, H., van den Brink, G. R., Bots, M., Medema, J. P., & Dannenberg, J.-H. (2015). HDAC1 and HDAC2 collectively regulate intestinal stem cell homeostasis. *The FASEB Journal*, *29*(5), 2070-2080. <https://doi.org/10.1096/fj.14-257931>
- Zong, D., Liu, X., Li, J., Ouyang, R., & Chen, P. (2019). The role of cigarette smoke-induced epigenetic alterations in inflammation. *Epigenetics & Chromatin*, *12*(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s13072-019-0311-8>
- Zong, X., Fu, J., Xu, B., Wang, Y., & Jin, M. (2020). Interplay between gut microbiota and antimicrobial peptides. *Animal Nutrition*, *6*(4), 389-396. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.09.002>
- Zou, F., Qiu, Y., Huang, Y., Zou, H., Cheng, X., Niu, Q., Luo, A., & Sun, J. (2021). Effects of short-chain fatty acids in inhibiting HDAC and activating p38 MAPK are critical for promoting B10 cell generation and function. *Cell Death & Disease*, *12*(6), 6. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03880-9>
- Zuo, T., & Ng, S. C. (2018). The Gut Microbiota in the Pathogenesis and Therapeutics of Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2247. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02247>
- Zupkovitz, G., Grausenburger, R., Brunmeir, R., Senese, S., Tischler, J., Jurkin, J., Rembold, M., Meunier, D., Egger, G., Lager, S., Chiocca, S., Propst, F., Weitzer, G., & Seiser, C. (2010). The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21 Is a Crucial Target for Histone Deacetylase 1 as a Regulator of Cellular Proliferation. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(5), 1171-1181. <https://doi.org/10.1128/MCB.01500-09>
- Zwamborn, R. A. J., Slieker, R. C., Mulder, P. C. A., Zoetemelk, I., Verschuren, L., Suchiman, H. E. D., Toet, K. H., Droog, S., Slagboom, P. E., Kooistra, T., Kleemann, R., & Heijmans, B. T. (2017). Prolonged high-fat diet induces gradual and fat depot-specific DNA methylation changes in adult mice. *Scientific Reports*, *7*, 43261. <https://doi.org/10.1038/srep43261>
- Zwiers, A., Kraal, L., Kraan, T. C. T. M. van de P., Wurdinger, T., Bouma, G., & Kraal, G. (2012). Cutting Edge : A Variant of the IL-23R Gene Associated with Inflammatory Bowel Disease Induces Loss of MicroRNA Regulation and Enhanced Protein Production. *The Journal of Immunology*, *188*(4), 1573-1577. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101494>



**Références des figures :**

- Aloi, M., Nuti, F., Stronati, L., & Cucchiara, S. (2014). Advances in the medical management of paediatric IBD. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 11(2), 99-108. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.158>
- Ashida, H., & Sasakawa, C. (2014). Shigella hacks host immune responses by reprogramming the host epigenome. *The EMBO Journal*, 33(22), 2598-2600. <https://doi.org/10.15252/embj.201489934>
- Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (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)
- Biswas, S., & Rao, C. M. (2018). Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *European Journal of Pharmacology*, 837, 8-24. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.08.021>
- Chang, J. T. (2020). Pathophysiology of Inflammatory Bowel Diseases. *New England Journal of Medicine*, 383(27), 2652-2664. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2002697>
- Chang, N. C. (2020). Autophagy and Stem Cells : Self-Eating for Self-Renewal. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.00138>
- Feil, R., & Fraga, M. F. (2012). Epigenetics and the environment : Emerging patterns and implications. *Nature Reviews. Genetics*, 13(2), 97-109. <https://doi.org/10.1038/nrg3142>
- Gimier, E., Barnich, N., & Denizot, J. (2018). Diet-Induced Epigenetic Modifications and Implications for Intestinal Diseases. In V. Patel & V. Preedy (Éds.), *Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics* (p. 1-21). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-31143-2\\_117-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31143-2_117-1)
- Khor, B., Gardet, A., & Xavier, R. J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), 307-317. <https://doi.org/10.1038/nature10209>
- Klinger, A. L., & Kann, B. R. (2019). Endoscopy in Inflammatory Bowel Disease. *The Surgical Clinics of North America*, 99(6), 1063-1082. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2019.08.005>
- Kostic, A. D., Xavier, R. J., & Gevers, D. (2014). The microbiome in inflammatory bowel disease : Current status and the future ahead. *Gastroenterology*, 146(6), 1489-1499. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.009>
- Kwon, D.-H., Ryu, J., Kim, Y.-K., & Kook, H. (2020). Roles of Histone Acetylation Modifiers and Other Epigenetic Regulators in Vascular Calcification. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3246. <https://doi.org/10.3390/ijms21093246>
- Laubach, Z. M., Perng, W., Dolinoy, D. C., Faulk, C. D., Holekamp, K. E., & Getty, T. (2018). Epigenetics and the maintenance of developmental plasticity : Extending the signalling theory framework. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 93(3), 1323-1338. <https://doi.org/10.1111/brv.12396>
- Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(6), 6. <https://doi.org/10.1038/nrc3932>
- Motta, V., Soares, F., Sun, T., & Philpott, D. J. (2015). NOD-like receptors : Versatile cytosolic sentinels. *Physiological Reviews*, 95(1), 149-178. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2014>
- Muhammad, J. S., Khan, N. A., Maciver, S. K., Alharbi, A. M., Alfahemi, H., & Siddiqui, R. (2022). Epigenetic-Mediated Antimicrobial Resistance : Host versus Pathogen Epigenetic Alterations. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(6), 809. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060809>
- Nguyen, H. T. T., Lapaquette, P., Bringer, M.-A., & Darfeuille-Michaud, A. (2013). Autophagy and Crohn's disease. *Journal of Innate Immunity*, 5(5), 434-443. <https://doi.org/10.1159/000345129>

- Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2016). Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria : Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Frontiers in Microbiology*, 7, 979. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>
- Shen, L., Weber, C. R., Raleigh, D. R., Yu, D., & Turner, J. R. (2011). Tight Junction Pore and Leak Pathways : A Dynamic Duo. *Annual review of physiology*, 73, 283-309. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142150>
- Woo, V., & Alenghat, T. (2022). Epigenetic regulation by gut microbiota. *Gut Microbes*, 14(1), 2022407. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2022407>
- Zhao, Y.-Q., Jordan, I. K., & Lunyak, V. V. (2013). Epigenetics components of aging in the central nervous system. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 10(4), 647-663. <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0229-y>



# Annexes

## Annexe 1

---

# Propionate catabolism by CD-associated adherent-invasive *E. coli* counteracts its anti-inflammatory effect

Agus, A., Richard, D., Faïß, T., Vazeille, E., Chervy, M., Bonnin, V., Dalmaso, G., Denizot, J., Billard, E., Bonnet, R., Buisson, A., Barnich, N., & Delmas, J.

2021

Gut Microbes

## Propionate catabolism by CD-associated adherent-invasive *E. coli* counteracts its anti-inflammatory effect

Allison Agus<sup>a,b</sup>, Damien Richard<sup>c</sup>, Tiphane Fais<sup>a,d</sup>, Emilie Vazeille<sup>a,e</sup>, Mélissa Chervy<sup>a</sup>, Virginie Bonnin<sup>a</sup>, Guillaume Dalmasso<sup>a</sup>, Jérémy Denizot<sup>a,f</sup>, Elisabeth Billard<sup>a,f</sup>, Richard Bonnet<sup>a,d</sup>, Anthony Buisson<sup>a,e</sup>, Nicolas Barnich<sup>a,f</sup>, and Julien Delmas<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>Inserm U1071, USC-INRAE 2018, Microbes, Intestin, Inflammation Et Susceptibilité De l'Hôte (M2ISH), Centre De Recherche En Nutrition Humaine Auvergne University Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France; <sup>b</sup>INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, University Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France; <sup>c</sup>Department of Pharmacology, University Hospital of Clermont-Ferrand, France; <sup>d</sup>Department of Bacteriology, University Hospital of Clermont-Ferrand, France; <sup>e</sup>Service d'Hépatogastro-Entérologie, 3iHP, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France; <sup>f</sup>Institut Universitaire De Technologie, University Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France

### ABSTRACT

Crohn's disease (CD) is a chronic and disabling inflammatory disorder of the gut that is profoundly influenced by intestinal microbiota composition, host genetics and environmental factors. Several groups worldwide have described an imbalance of the gut microbiome composition, called dysbiosis, in CD patients, with an increase in *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* and a decrease in *Firmicutes*. A high prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) pathobionts has been identified in the intestinal mucosa of CD patients. A significant loss in the bacteria that produce short-chain fatty acids (SCFAs) with anti-inflammatory properties, such as propionate, is also a consequence of dysbiosis in CD patients. Here, the AIEC reference strain LF82 was able to degrade propionate in the gut, which was sufficient to counteract the anti-inflammatory effect of propionate both in *in vitro* models and in mice with DSS-induced colitis. The consumption of propionate by AIEC pathobionts leads to an increase in TNF- $\alpha$  production by macrophages upon infection through the bacterial methyl-citrate pathway. To induce the protective effects of SCFAs on the inflamed gut, we used a G-protein-coupled receptor 43 agonist (GPR43 agonist) that is not metabolizable by intestinal bacteria. Interestingly, this agonist showed anti-inflammatory properties and decreased the severity of colitis in AIEC-infected mice, as assessed by an improvement in the disease activity index (DAI) and a decrease in AIEC pathobiont encroachment. Taken together, these results highlight the effectiveness of GPR43 agonist treatment in the control of gut inflammation and improved our understanding of the ability of AIEC to modulate propionate availability to create an infectious niche to its advantage.

### ARTICLE HISTORY

Received 20 April 2020  
Revised 2 October 2020  
Accepted 5 October 2020




### KEYWORDS


Crohn's disease; adherent-invasive *E. coli*; propionate; methyl-citrate pathway; GPR43 agonist treatment

## Introduction

The gut microbiota influences health and the nutritional stage *via* multiple mechanisms, and a large amount of evidence has shown that microbial metabolites have a major effect on host physiology. Short-chain fatty acids (SCFAs), predominantly acetate, propionate, and butyrate, are produced in the human large intestine by anaerobic fermentation of undigested carbohydrates, crude fibers, and polysaccharides.<sup>1</sup> Depending on diet and gut microbiota composition, the intestinal SCFAs concentration can range from 60 to 150 mmol/L,<sup>2</sup> with butyrate, propionate, and acetate present at a nearly

constant molar ratio of 15:25:60.<sup>3</sup> SCFAs have various beneficial roles in the gastrointestinal tract: they provide energy to the gut epithelium, promote intestinal epithelial integrity and are involved in the regulation of immune and inflammatory responses.<sup>4–7</sup> Propionate has potent immunomodulatory effects and reduces the colonic expression of proinflammatory factors in mice with DSS-induced colitis.<sup>8</sup> Most effects on intestinal inflammation are achieved through activation of the G protein-coupled receptor 43 (GPR43) SCFAs receptor,<sup>9</sup> which is predominantly expressed in the colonic epithelium, adipose tissue and immune

**CONTACT** Julien Delmas  [jdelmas@chu-clermontferrand.fr](mailto:jdelmas@chu-clermontferrand.fr); Allison Agus  [allison.agus@inrae.fr](mailto:allison.agus@inrae.fr)  Inserm U1071, USC-INRAE 2018, Microbes, Intestin, Inflammation Et Susceptibilité De l'Hôte (M2ISH), Centre De Recherche En Nutrition Humaine Auvergne, University Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France

 Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

© 2021 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



cells.<sup>10–12</sup> Contradictory findings have been reported in GPR43<sup>-/-</sup> mice regarding inflammatory phenotypes, leading to a lack of consensus.<sup>13</sup> Confirming the role of this SCFAs receptor in human physiology is necessary to better understand the implications for intestinal inflammation, especially in the context of Crohn's disease (CD). Recently, a fascinating study highlighted the role of Reg3-mucosal lectins, gut microbiota-derived propionate and its GPR43 receptor as a crucial mediator axis for gut epithelial regeneration in colitis.<sup>14</sup>

Acetate and propionate serve as the most potent activators of the GPR43 receptor, followed by butyrate and other SCFAs.<sup>6</sup> In contrast to acetate, propionate levels have been reported to be markedly decreased in patients with CD compared with healthy individuals.<sup>15</sup> Nevertheless, a recent study observed no significant differences in fecal concentrations of SCFAs in CD patients.<sup>16</sup> Thus, these variations in SCFAs concentrations in CD patients could depend on the cohort and be the consequence of a specific treatment, such as exclusive enteral nutrition (EEN) or specific diet therapy.<sup>17</sup>

The abundance of propionate-producing bacterial species, such as *Veillonella* and *Bacteroides fragilis*, decreases in CD patients with low propionate levels.<sup>15</sup> The decrease in the abundance of Bacteroidetes is a feature regularly found in CD patients and could contribute to inflammation<sup>18</sup> since some bacteria belonging to this phylum, such as *Bacteroides fragilis*, have also been shown to exhibit protective effects in a mouse model of colitis.<sup>19–21</sup> These results support the notion that the metabolism of propionate may play an important role in the pathogenesis of CD. It has also been consistently reported that CD patients have relatively high amounts of *Escherichia coli*, particularly the adherent-invasive *E. coli* (AIEC) pathobionts.<sup>22–26</sup> These bacteria strongly adhere to and invade intestinal epithelial cells (IECs), survive within macrophages, move into deep tissues and activate immune cells, inducing inflammatory cytokines secretion.<sup>27</sup> We have previously identified various pathways, including serine and ethanolamine catabolism and propionyl-CoA utilization, that may help in the metabolic adaptation of AIEC strains to their environments.<sup>28,29</sup> In *E. coli*, propionate is converted to propionyl-CoA, which is a coenzyme A derivative of propionic acid, is transformed into 2-methyl-

citrate by the methyl-citrate synthase (encoding by the *prpC* gene) and then into pyruvate and succinate. If the *prpC* gene is deleted, the methyl-citrate cycle will not occur. We found that genes involved in this pathway, such as *prpC*, were strongly upregulated in the AIEC strain LF82 under intestinal conditions (in the presence of bile and mucins).<sup>28</sup> The aim of this study was to determine whether AIEC pathobionts are able to degrade propionate in the intestinal tract of CD patients and to evaluate the effect of propionate catabolism on host responses to AIEC infection.

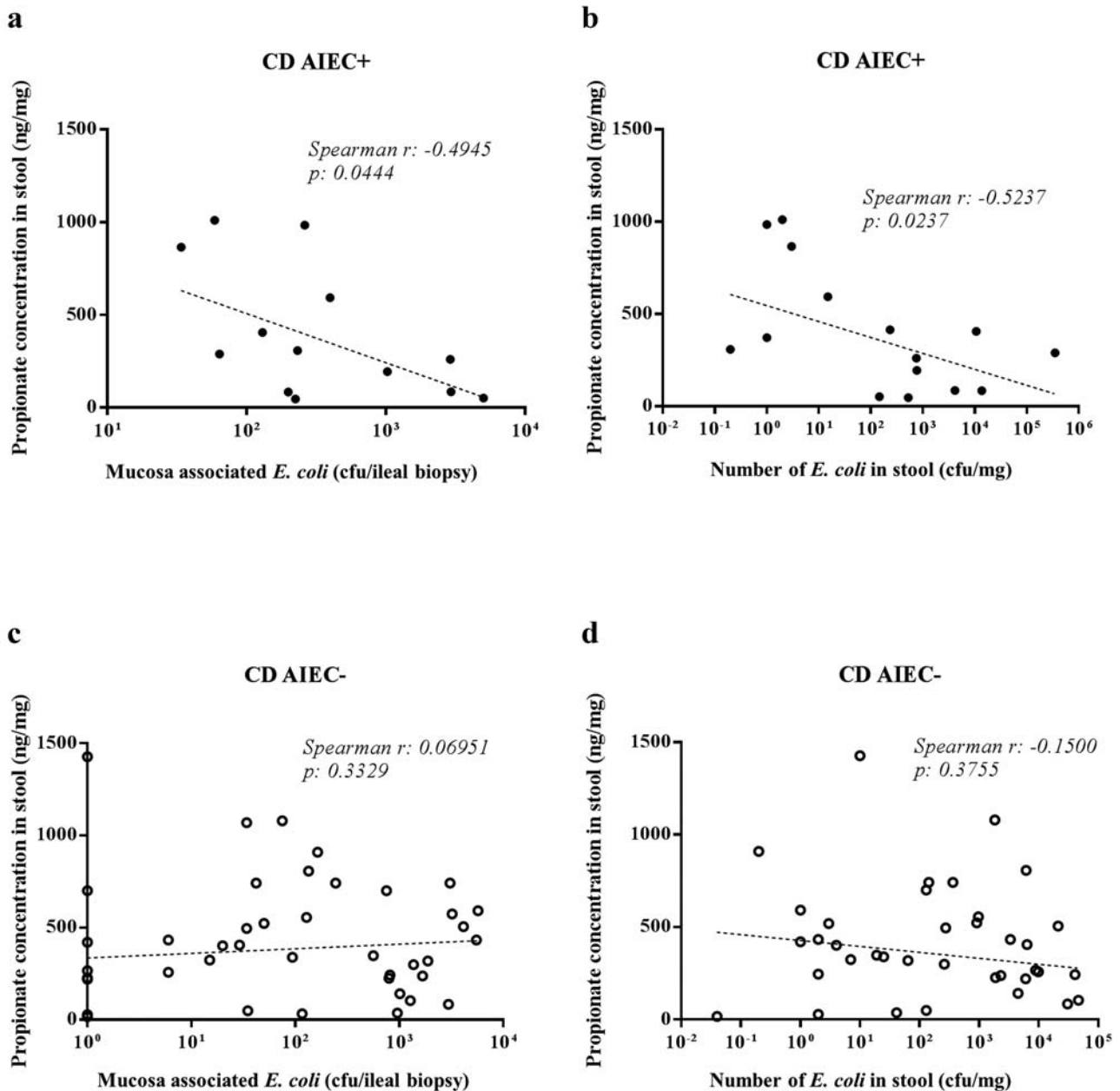
## Results

### The fecal abundance of *E. coli* in CD patients colonized by AIEC is inversely correlated with propionate concentration in the gut

A prospective and multicenter study including CD patients was conducted in our unit, and the abundance and global invasive ability of *E. coli* were analyzed in stool samples and in ileal specimens of CD patients colonized by ileal AIEC (CD AIEC+) or non-AIEC (CD AIEC-) strains. We quantified the acetate and propionate concentrations in stool samples from patients colonized or not colonized with AIEC bacteria. The acetate concentration in stools was negatively correlated with the fecal abundance of *E. coli* in CD AIEC+ ( $r = -0.6416$ ,  $p = 0.0058$ ; **Figure S1**), while no correlation was observed between the acetate concentration in stools and ileal abundance of *E. coli* ( $r = -0.3077$ ,  $p = 0.1531$ ). Interestingly, the propionate concentration in stools was negatively correlated with both the ileal and fecal abundances of *E. coli* for CD AIEC+ ( $r = -0.4945$ ,  $p = 0.0444$ ;  $r = -0.5237$ ,  $p = 0.0237$ , respectively) but not for CD AIEC- ( $r = -0.06951$ ,  $p = 0.3329$ ;  $r = -0.1500$ ,  $p = 0.3755$ ) (**Figure 1**). This decreased level of propionate might be due to decreased abundance of propionate-producing bacteria and/or an increase in propionate degradation by the gut microbiota of AIEC-colonized CD patients and possibly by the AIEC themselves.

### The AIEC LF82 strain counteracts the anti-inflammatory effect of propionate *in vitro*

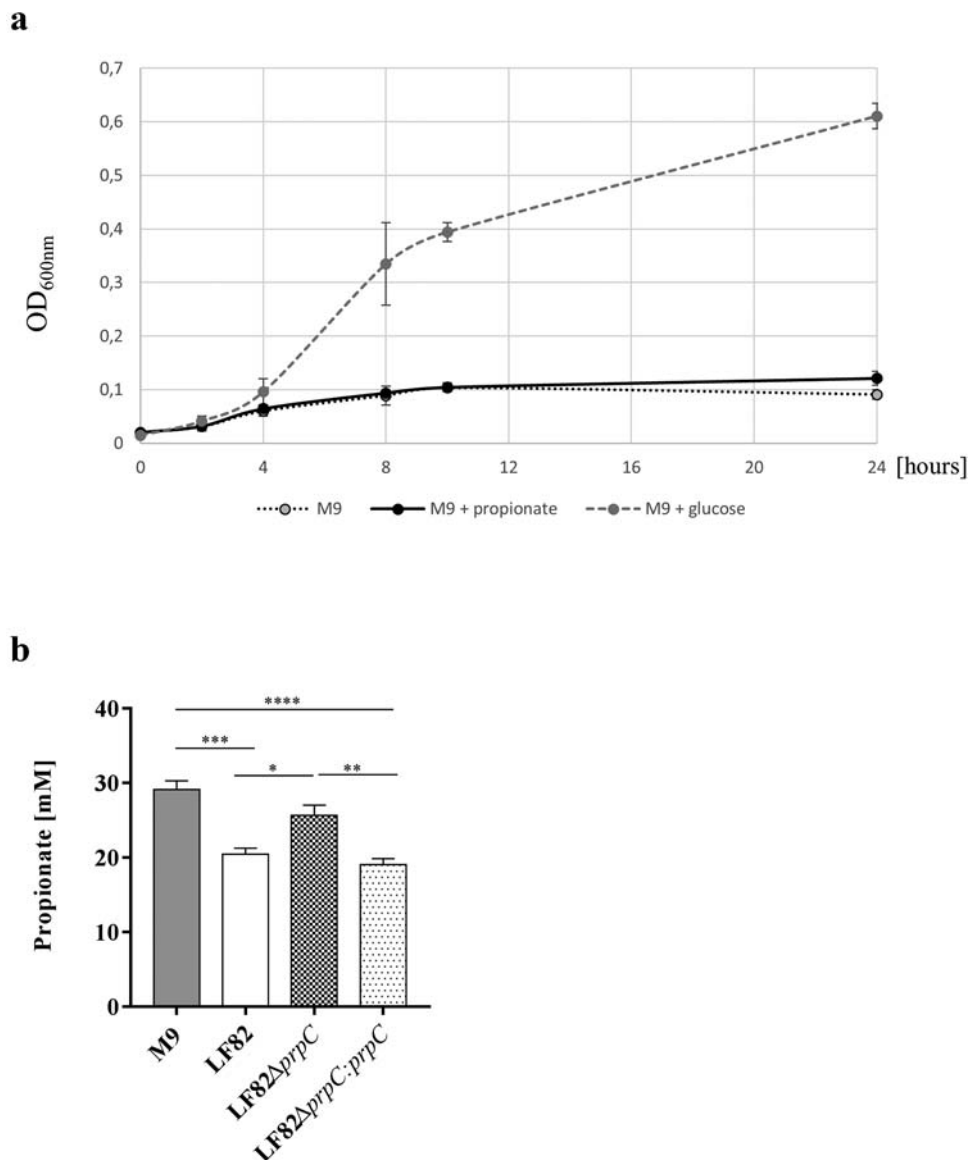
To evaluate the ability of the AIEC LF82 strain to utilize propionate as the sole source of carbon,



**Figure 1.** Inverse correlation between the fecal level of propionate and the number of *E. coli* in the stool samples and ileal mucosa of Crohn's disease patients. Correlation between the level of propionate and the number of *E. coli* bacteria associated with the ileal mucosa (a, c) and present in the stool samples (b, d) from Crohn's disease patients; AIEC+ (a, b) and AIEC- (c, d). Spearman correlation analysis was performed between propionate concentration and the number of *E. coli* in pairwise comparisons (CFU: colony-forming unit).

propionate was added to a minimal medium. As shown in Figure 2a, the AIEC LF82 strain replicated extremely poorly in minimal medium (M9 or M9 containing propionate). To determine whether the AIEC strain LF82 catabolizes propionate, the AIEC strain LF82, the LF82 $\Delta prpC$  isogenic mutant and the corresponding trans-complemented mutant LF82 $\Delta prpC:prpC$  were grown in minimal medium supplemented with 30 mM propionate. After 24 h of

incubation, the propionate concentration was significantly lower in medium incubated with the LF82 strain and the LF82 $\Delta prpC:prpC$  mutant than in minimal medium incubated with the LF82 $\Delta prpC$  mutant (Figure 2b). This result indicates that the AIEC strain LF82 is able to degrade propionate through the methyl-citrate pathway. It has been reported that propionate reduces the production of proinflammatory factors, including TNF- $\alpha$ .<sup>30,31</sup> To determine

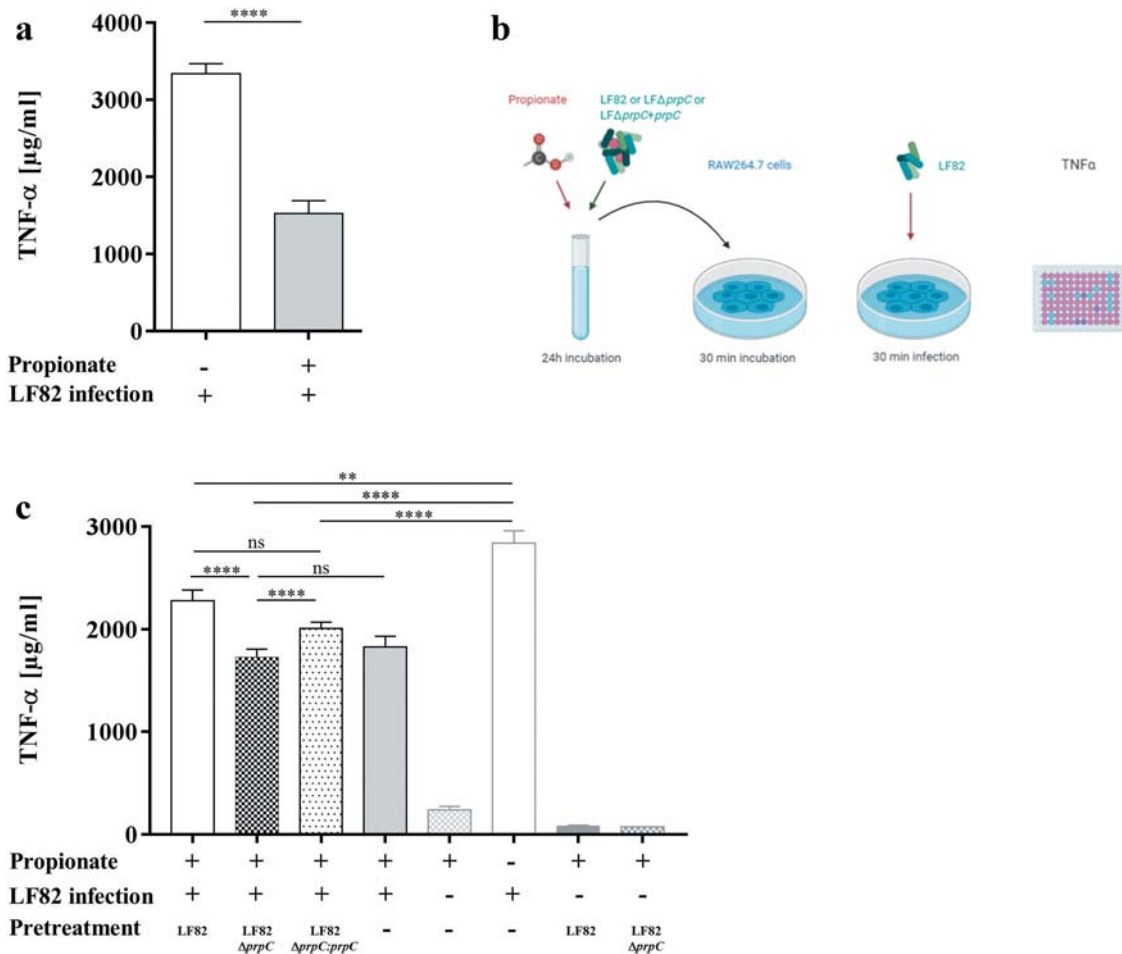


**Figure 2.** The AIEC strain LF82 catabolizes propionate. (a) Bacterial growth curves of the LF82 strain in M9 supplemented with 30 mM propionate or 10 mM glucose. (b) The AIEC strain LF82, the AIEC LF82ΔprpC isogenic mutant and the corresponding trans-complemented mutant LF82ΔprpC:prpC were grown in minimal medium supplemented with 30 mM propionate. After 24 h of incubation, the propionate concentration was measured. The experiment was performed in duplicate with  $n = 3$  at each time. The results are the mean  $\pm$  SEM. Statistical comparisons were carried out by one-way ANOVA with the Bonferroni post hoc test ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ) after normality testing using the Kolmogorov-Smirnov test.

whether the degradation of propionate by AIEC LF82 can have an impact on the production of proinflammatory cytokines, murine macrophage RAW264.7 cells were used. First, these cells were incubated with or without propionate for 30 min before a short period of infection with AIEC LF82 (MOI 10). As expected, propionate decreased the production of TNF- $\alpha$  by 54% (Figure 3a). Then, the AIEC LF82 strain, the LF82ΔprpC mutant and the trans-complemented LF82ΔprpC:prpC strain were preincubated

with propionate for 24 h. A medium with propionate preincubated without addition of bacteria was used as control. The RAW264.7 cells were incubated with this conditioned medium, and then the cells were infected or not with the LF82 strain (Figure 3b).

TNF- $\alpha$  levels were significantly reduced in cells incubated with propionate pretreated with the mutant LF82ΔprpC compared to the levels in cells incubated with propionate pretreated with the LF82 or LF82ΔprpC:prpC strain (Figure 3c). In addition,



**Figure 3.** The AIEC LF82 strain counteracts the anti-inflammatory effect of propionate *in vitro*. (a) Secreted TNF- $\alpha$  amounts, quantified by ELISA, in supernatants of murine macrophage RAW264.7 cells incubated or not with propionate (30 mM) for 30 min before a short period of infection with AIEC LF82 (MOI 10). (b) The AIEC LF82 strain, the LF82 $\Delta prpC$  mutant and trans-complemented LF82 $\Delta prpC::prpC$  were preincubated with propionate for 24 h. The RAW264.7 cells were incubated with this incubation medium before infection with the LF82 strain. Secreted TNF- $\alpha$  levels in supernatants of murine RAW264.7 macrophages were measured. (c) Secreted TNF- $\alpha$  amounts in supernatants of murine macrophage RAW264.7 cells incubated with LF82, LF82 $\Delta prpC$  or LF82 $\Delta prpC::prpC$  (MOI 10) pretreated with propionate (propionate +) before incubation with cells and then infected or not with AIEC LF82 (n = 3). The results are the mean  $\pm$  SEM of three experiments. Statistical analysis was carried out by normality testing using the Kolmogorov-Smirnov test and subsequent two-tailed Student's t-test (A) or a one-way ANOVA with the Bonferroni post hoc test (c) (\* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\*\* $p < .0001$ ).

no significant difference was observed between cells incubated with propionate pretreated with the mutant LF82 $\Delta prpC$  and cells incubated with propionate but not pretreated with bacteria.

These results suggest that propionate degradation by AIEC pathobionts could participate in the uncontrolled production of proinflammatory mediators in AIEC-positive CD patients.

### The AIEC LF82 strain decreases the propionate concentration *in vivo*

CEABAC10 mice were orally challenged with the AIEC LF82 strain or the LF82 $\Delta prpC$  isogenic

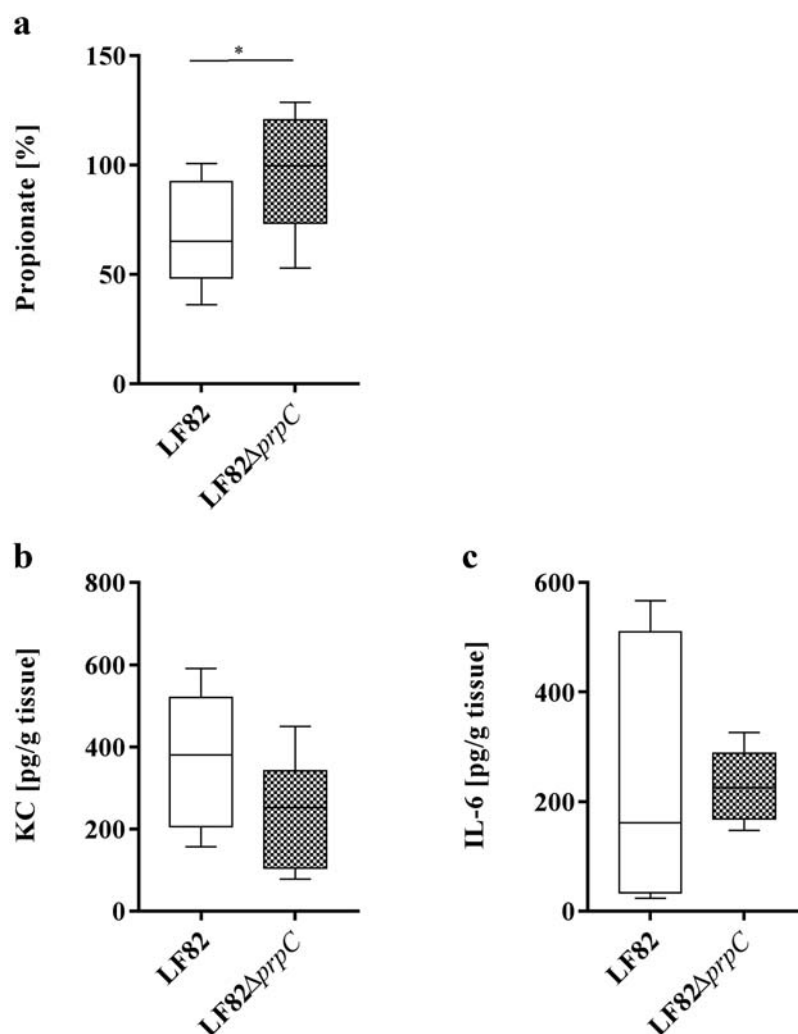
mutant. Quantification of bacteria in stool samples or of bacteria associated with the intestinal mucosa showed no difference in colonization between the wild-type and mutant strains, suggesting that propionate metabolism is not essential for AIEC LF82 colonization (**Figure S2**). The fecal samples of each mouse were pooled before and after infection. The mean concentration of propionate before infection was normalized as 100% (95  $\pm$  19 or 80  $\pm$  22  $\mu\text{g}/\text{g}$  fecal propionate in mice infected with LF82 or LF82 $\Delta prpC$ , respectively). The results showed a 40% decrease in propionate concentration in mice infected with the AIEC LF82 strain (63  $\pm$  18  $\mu\text{g}/\text{g}$  propionate), while no overall decrease

was observed in mice infected with LF82 $\Delta$ *prpC* ( $73 \pm 17$   $\mu$ g/g propionate, Figure 4a). The decrease in the propionate concentration was not associated with increased secretion of the proinflammatory chemokine KC (keratinocyte-derived chemokine, Figure 4b) or cytokine IL-6 (Figure 4c). However, it has been previously described that AIEC requires a particular context to participate in the inflammatory process, such as colitis or antibiotic treatment.<sup>32</sup>

#### The AIEC LF82 strain counteracts the anti-inflammatory effect of propionate in mice

Pathobiont AIEC LF82 bacteria exacerbate colitis in DSS-treated mice,<sup>33</sup> and it has been reported that

oral administration of propionate could ameliorate DSS-induced colitis mainly by reducing inflammation.<sup>8</sup> Mice treated with DSS and supplemented with propionate were infected with LF82 strain. The effect of propionate supplementation on colonic inflammation was evaluated by determining the disease activity index (DAI) score and by detecting the release of proinflammatory cytokines by colonic tissues. No significant difference in disease activity index and the release of KC and IL-6 was observed between mice treated or not with propionate. No statistically significant difference of ileal colonization by LF82 was also observed after propionate supplementation (Figure S3). The lack of a significant anti-inflammatory effect

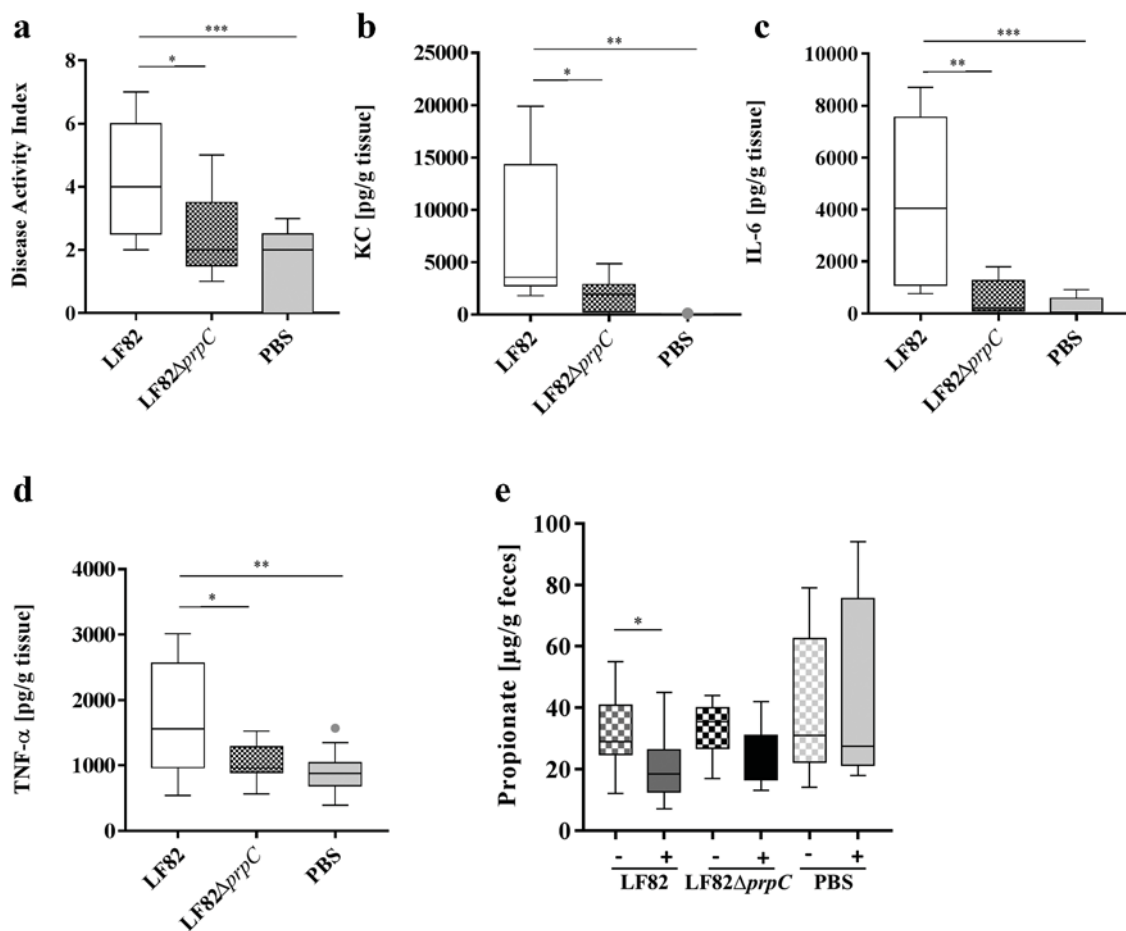


**Figure 4.** AIEC LF82 decreases the propionate concentration *in vivo*. CEABAC10 mice ( $n = 8$  for each group) were pretreated with fosfomycin (2 g/L) for 4 days and orally infected with the LF82 strain or the isogenic mutant LF82 $\Delta$ *prpC*. (a) Propionate concentrations in fecal samples of mice collected after infection with LF82 or LF82 $\Delta$ *prpC*. For each mouse, fecal samples collected before infection with the LF82 strain were pooled, and the concentration of propionate was determined as 100%. (b) Secreted KC chemokine and (c) IL-6 cytokine amounts from colonic tissue of infected mice 2 days post infection. The results are presented as the median. Statistical comparisons were carried out by normality testing using Kolmogorov-Smirnov tests and a subsequent two-tailed Student's *t*-test ( $*p < .05$ ).



of propionate may be related to its degradation by AIEC bacteria. To test this hypothesis, mice treated with DSS and supplemented with propionate were infected with LF82 or the LF82 $\Delta$ *prpC* mutant. The DAI score of mice infected with AIEC LF82 bacteria was significantly higher than that of mice infected with the LF82 $\Delta$ *prpC* mutant or uninfected mice (control mice, Figure 5a). The released levels of the proinflammatory chemokine KC (keratinocyte-derived chemokine), cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  were very low in the control mice (Figure 5b–Figure 5d), probably because propionate decreased DSS-induced inflammation. In contrast, the levels of these cytokines were increased in mice infected

with *E. coli* strains, and they were significantly higher in mice infected with LF82 bacteria than in mice infected with LF82 $\Delta$ *prpC*. These results reveal that the LF82 strain can counteract the anti-inflammatory effect of propionate in transgenic mice and suggest that the methyl-citrate pathway is involved in the virulence of the AIEC LF82 strain. Quantification of bacteria in stool samples or associated with the intestinal mucosa showed no difference in colonization between the wild-type and mutant strains (Figure S4). To determine whether inflammation was associated with a decrease in propionate levels in the mouse gut, fresh fecal samples were collected before and after infection for



**Figure 5.** The AIEC LF82 strain counteracts the anti-inflammatory effect of propionate in mice. CEABAC10 mice ( $n = 9$ , two independent experiments pooled) were pretreated with an antibiotic cocktail containing 500 mg/L metronidazole, 1 g/L streptomycin, 1 g/L neomycin and 1 g/L ampicillin. Mice received 1% DSS and, when needed, 0.6% calcium propionate in their drinking water in parallel with antibiotic treatment. On day 5, the antibiotic treatment was stopped; 0.25% DSS and 0.6% propionate were maintained in the drinking water. On day 6, mice were orally infected with AIEC LF82, the isogenic mutant LF82 $\Delta$ *prpC*, or PBS as a control. (a) Disease activity index of mice. (b–d) Secreted KC chemokine, IL-6 and TNF- $\alpha$  cytokines amounts from colonic tissue of mice. (e) Propionate concentrations from fecal samples of mice before and after infection. The results are presented as the median values. Statistical comparisons were carried out by normality testing using Kolmogorov-Smirnov tests, and a subsequent one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test was performed (a–d). A nonparametric Friedman test was applied to assess differences in propionate concentration before and after infection (e) (\* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ ).

each mouse. The propionate concentration was significantly decreased in mice infected with the LF82 strain compared to the basal level ( $p = 0.045$ ), in contrast to the level in mice infected with the LF82 $\Delta$ *prpC* mutant ( $p > .999$ ) (Figure 5e). In the control group, this propionate concentration did not vary ( $p > .999$ ). Overall, these results suggest that AIEC pathobionts may be able to decrease the propionate concentration in the intestine, which would impair the control of inflammation by this SCFA.

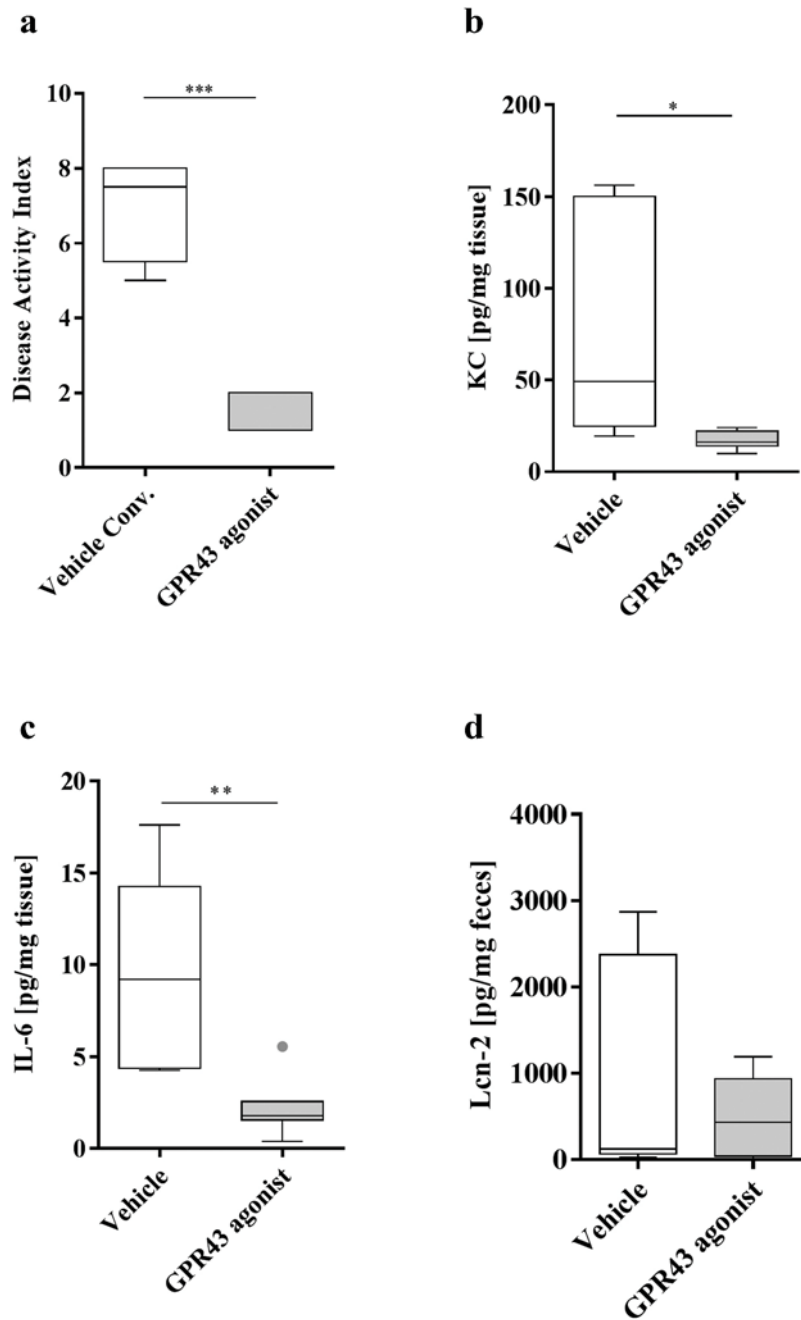
### **The GPR43 agonist decreases the severity of colitis in AIEC LF82-infected mice**

The anti-inflammatory effect of propionate is mediated by activation of the GPR43 receptor. We tested the efficiency of an agonist of the GPR43 receptor that cannot be metabolized by intestinal bacteria to control the inflammation induced by the AIEC pathobiont. Thus, we evaluated the impact of GPR43 agonist administration on gut inflammation in AIEC LF82-infected mice. The DAI score indicated that the GPR43 agonist was effective in decreasing the signs of colitis induced by AIEC colonization from day 10 post infection (Figure 6a). The release of the proinflammatory cytokines KC and IL-6 in mice treated with the GPR43 agonist was significantly lower than that in mice receiving the vehicle only (5.5- and 4.3-fold decrease, respectively, Figure 6b, Figure 6c). Moreover, the GPR43 agonist led to decreased fecal levels of lipocalin-2, which is a sensitive biomarker for intestinal inflammation (Figure 6d). Thus, we demonstrated the anti-inflammatory effect of GPR43 receptor agonists in the context of AIEC encroachment. In addition, the GPR43 agonist seems to be very effective in eliminating AIEC bacteria from the gut, as observed by quantification in the fecal samples and in the intestinal tissues. Indeed, 2-days post infection, a significant decrease in the AIEC LF82 bacterial load in feces was observed for mice treated with the GPR43 agonist compared to mice receiving the vehicle only (Figure 7a). In addition, in mice treated with the GPR43 agonist, the number of bacteria associated with colonic and ileal tissues was significantly reduced (Figure 7b, Figure 6c). These results demonstrate that GPR43 agonist treatment effectively decreases AIEC LF82

colonization in the gut of transgenic mice. Propionate treatment has been shown to upregulate the expression of Reg3 $\beta$  and  $\gamma$ , which are antimicrobial peptides at mucosal surfaces of the gut, in the colon of DSS-treated mice.<sup>14</sup> Therefore, we analyzed Reg3 mRNA expression in mice treated or not with the GPR43 agonist and observed a significant increase of Reg3 $\beta$  and Reg3 $\gamma$  levels in mice treated with the GPR43 agonist compared to untreated mice (Figure 7d, Figure 6e). These observations reinforce the hypothesis that GPR43 agonist supplementation could participate in the protection of mice against AIEC LF82 bacterial infection. Interestingly, Park *et al.* demonstrated that SCFAs could restore the turnover of IECs in antibiotic-treated mice.<sup>34</sup> In our study, the GPR43 agonist treatment does not modify the colonic expression level of genes implicated in epithelial differentiation (*Olfm4*, *Hes1*, *Atoh1* and *Muc2*) and IEC proliferation (*Pcna*, *CyclinD1* and *CyclinA*). Additionally, we did not observe any change in expression of colonic crypt length measurements, suggesting that the protection mediated by the GPR43 agonist seems to be more targeted toward an anti-inflammatory phenotype (Figure S5).

### **Discussion**

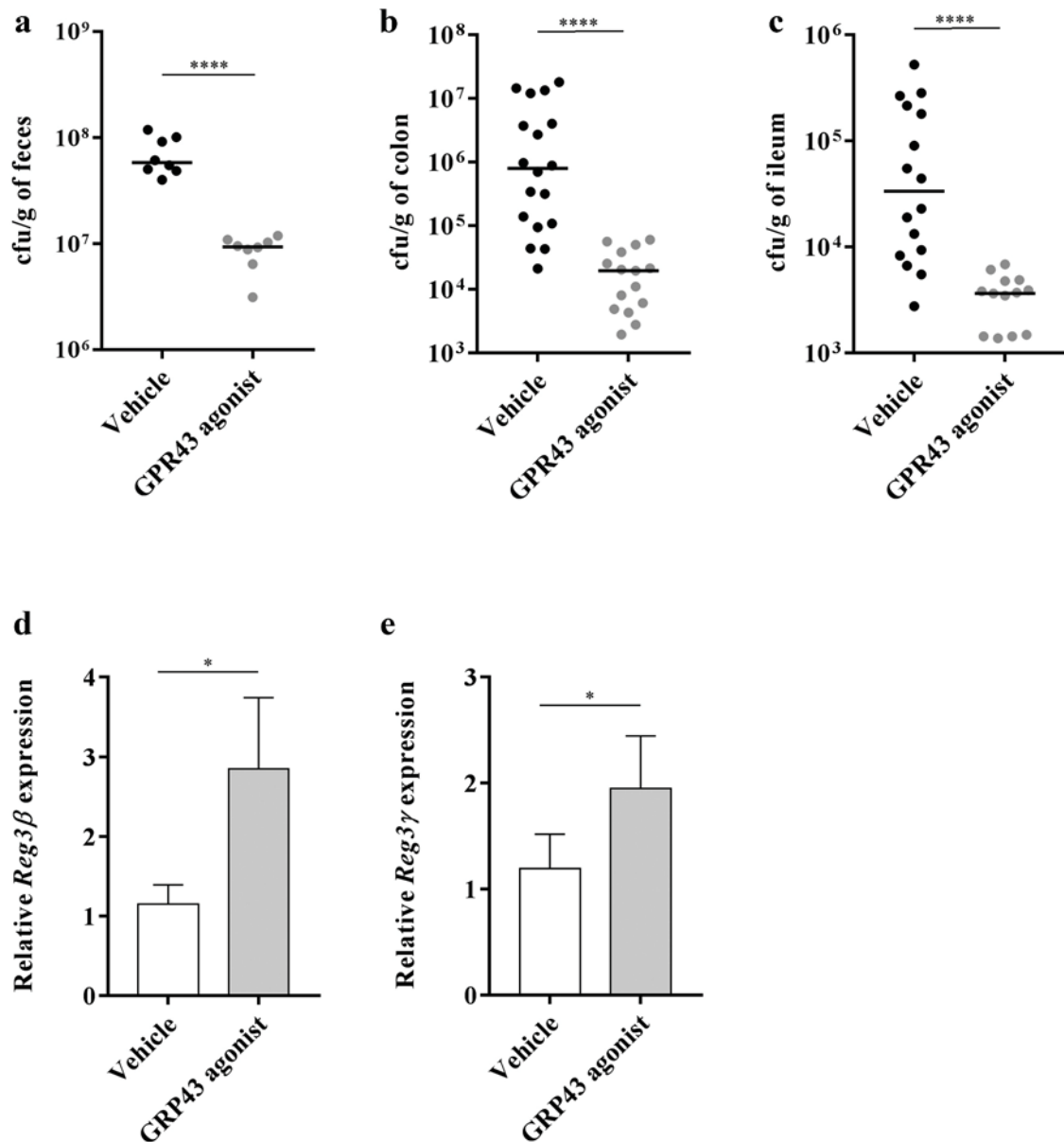
In the present study, we showed that the AIEC LF82 strain counteracts the anti-inflammatory effect of propionate in a mouse model of DSS-induced colitis. First, we found that propionate reduced inflammation in the colonic tissues of mice, which is consistent with other studies.<sup>8,35</sup> Oral administration of propionate has beneficial effects on the intestinal epithelium by improving intestinal barrier function, inhibiting inflammation, and modulating oxidative stress in mice with DSS-induced colitis.<sup>8</sup> Propionate also regulates the size and function of the colonic Treg pool and protects against colitis in a GPR43-dependent manner in mice.<sup>35</sup> AIEC exacerbate intestinal inflammation in mice treated with DSS.<sup>36</sup> In the present study, we revealed that colonic inflammation induced by AIEC pathobionts in transgenic mice is not prevented by propionate administration but is prevented by a nonmetabolizable GPR43 receptor agonist. We showed here that



**Figure 6.** The GPR43 agonist decreases the severity of colitis in AIEC LF82-infected mice. CEABAC10 mice ( $n = 8$  for each group) were pretreated with an antibiotic cocktail containing 500 mg/L metronidazole, 1 g/L streptomycin, 1 g/L neomycin and 1 g/L ampicillin. Mice were orally challenged for 7 days with  $10^9$  CFU of AIEC LF82 bacteria and with 5 mg/kg/day GPR43 agonist. Simultaneously, the drinking water of the mice was supplemented with 0.25% DSS. (a) Disease activity index (DAI) of AIEC LF82-exposed mice on day 10. (b, c) Secreted KC and IL-6 cytokines in colonic tissue culture supernatant. (d) Secreted lipocalin-2 (Lcn-2) in the feces of mice treated with the GPR43 agonist and of untreated mice. The results are presented as the median values. Statistical comparisons were carried out by normality testing using Kolmogorov-Smirnov tests, and a subsequent two-tailed Student's test (b,c) or Mann-Whitney U-test (a-d) was performed ( $*p < .05$ ,  $**p < .01$ ,  $***p < .001$ ).

AIEC bacteria are able to degrade propionate *in vitro*. In contrast, a mutant with a nonfunctional *prpC* gene cannot catabolize propionate through the methyl-citrate pathway. This AIEC $\Delta$ *prpC* mutant failed to induce an

inflammatory response in mice. These results suggest that AIEC pathobionts counteract the anti-inflammatory effect of propionate in mice by degrading this compound. This hypothesis is reinforced by the decreased propionate concentration



**Figure 7.** The GPR43 agonist displays anti-adhesive properties in AIEC LF82-infected mice. CEABAC10 mice were infected with AIEC LF82 and treated orally by gavage with 5 mg/kg/d GPR43 agonist or vehicle only. (a) AIEC LF82 quantification in the feces of mice treated with the GPR43 agonist compared to mice treated with vehicle 2 days post infection ( $n = 8$  for each group). (b,c) Colonic and ileum-associated *E. coli* bacteria from infected CEABAC10 mice 2 days post infection ( $n = 23$ , three independent experiments pooled). (d,e) Reg3 $\beta$  and Reg3 $\gamma$  mRNA were quantified by RT-qPCR in colonic mucosa of mice ( $n = 8$  for each group). Each symbol represents an individual mouse, and lines show medians (a–c). The results of mRNA expression are the mean  $\pm$  SEM (d,e). Statistical comparisons were carried out by normality testing using Kolmogorov-Smirnov tests, and a subsequent two-tailed Student's test (a) or Mann-Whitney U-test (b,c) or non-parametric one-tailed Mann-Whitney U-test (D-E) was performed (\* $p < .05$ , \*\*\*\* $p < .0001$ ).

in fecal samples in mice infected with AIEC pathobionts. Additionally, we found a negative correlation between the propionate concentration and the fecal abundance of *E. coli* in stool samples of CD patients colonized by AIEC pathobiont strains. Our results thus support the idea that a high rate of colonization by AIEC pathobionts causes a decrease in propionate concentration, which

may be associated with impaired regulation of intestinal inflammation in CD patients.<sup>15,37</sup> However, the high abundance of *E. coli* in the gut of CD patients could also be associated with decreased SCFAs production since butyrate-producing bacterial species, such as *Faecalibacterium*, and propionate-producing bacterial species, such as *Veillonella* and *Bacteroides*

*fragilis*, are decreased in CD patients. The decrease in the abundance of *Faecalibacterium* and *Bacteroidetes* is a feature regularly found in CD patients.<sup>36</sup> Hence, it could conceivably be hypothesized that the decrease in propionate observed in CD patients is due to the low abundance of propionate-producing bacteria combined with the high abundance of *E. coli* strains such as AIEC pathobionts that are able to degrade propionate.

Prior studies have noted the importance of SCFAs for constant repair of the intestinal epithelium, suggesting that propionic and butyric acid could be useful in the treatment of inflammatory disorders, including CD.<sup>38,39</sup> However, contradictory effects of SCFAs on intestinal inflammation in patients with colitis and in murine models have been reported.<sup>40–42</sup> The variable abundance of propionate-degrading bacteria, such as AIEC, could explain these inconsistent effects to a certain extent. It has recently been shown that AIEC pathobionts adapt to prolonged exposure to propionate, resulting in an increase in virulence. Indeed, upon exposure to propionic acid, highly virulent AIEC variants having enhanced AIEC phenotype emerge (increase in adhesion, invasion and biofilm formation).<sup>43</sup> We completed this data analysis to reveal that AIEC degrade propionate through the methyl-citrate pathway and counteract the anti-inflammatory effect of propionate. We have previously shown that in the presence of bile, an interaction among ethanolamine utilization, 1,2 propanediol degradation and the methyl-citrate pathway provides an energetic advantage to the AIEC LF82 strain.<sup>28</sup> A study by Ormsby *et al.*<sup>44</sup> reinforced the link between these pathways by showing that propionate stimulates AIEC-mediated degradation of ethanolamine. Additionally, ethanolamine utilization confers a competitive advantage to AIEC strains in gut colonization.<sup>28</sup> Intestinal ethanolamine is readily available during periods of intestinal inflammation.<sup>44</sup> In summary, it can be suggested that dietary supplementation with propionate may be inefficient, if not harmful, for CD patients colonized by AIEC bacteria.

Thus, one of the possible strategies to restore the beneficial effects of SCFAs or fermentable dietary fibers would be to use nonmetabolizable SCFAs-G-protein-coupled receptor agonists. In the present

study, we evaluated the efficacy of a G-protein-coupled receptor 43 agonist against gut inflammation induced by AIEC pathobiont infection in a mouse model and showed that the GPR43 receptor agonist significantly decreased the severity of colitis in the presence of AIEC pathobionts in the gut. It has been reported that activation of the GPR43 receptor has a protective effect against colitis by favoring the differentiation and function of colonic Tregs.<sup>35,45,46</sup> One unanticipated finding was that GPR43 agonist administration to mice counteracted the intestinal colonization by AIEC pathobionts. This result may be explained by the overall decrease in inflammation. Indeed, although it is recognized that AIEC pathobionts may be considered an initiating factor for inflammation in CD, it has been previously reported that persistent colonization by AIEC pathobionts is also favored in an inflammatory context,<sup>32,47</sup> and overgrowth of the AIEC population may be related to a metabolic shift to catabolize L-serine in the inflamed gut.<sup>29</sup> Moreover, activation of the GPR43 receptor is associated with neutrophil chemotaxis, T cell differentiation, activation and subsequent cytokines production.<sup>6</sup> The role of the SCFAs/GPR43 axis was demonstrated in the maintenance of epithelial integrity, inducing mucosal healing and suppressing inflammation.<sup>7</sup> In a previous study, we demonstrated that downregulation of SCFAs-sensitive GPR43 is associated with gut inflammation, a phenomenon restored by GPR43 agonist treatment of DSS-induced colitis.<sup>48</sup> Recently, propionate induces Reg3 in intestinal organoids and in gnotobiotic mice colonized with a defined microbiota-producing SCFAs.<sup>14</sup> Reg3 $\beta$  has bactericidal activity against Gram-negative bacteria. Moreover, Park *et al.* demonstrate that Gram-positive commensal bacteria are a major determinant of IEC turnover, and that their stimulatory effect seems to be mediated by SCFAs.<sup>34</sup> In our study, the GPR43 agonist seems to induce Reg3 $\beta$  and Reg3 $\gamma$  genes expression that probably could contribute to the decrease of AIEC LF82 colonization. No induction of epithelial differentiation and proliferation mechanisms was observed, that could suggest that the effects of the GPR43 agonist are more targeted toward an anti-inflammatory phenotype.

Interestingly, we demonstrate here the efficiency of this GPR43 agonist in AIEC LF82-infected



transgenic CEABAC10 mice. Therefore, as GPR43 regulates the colonization and/or encroachment abilities of the AIEC pathobiont, it could be relevant as a therapeutic approach for AIEC-colonized CD patients.

In summary, our study identified a new mechanism that improves our understanding of the proinflammatory potential of AIEC pathobionts in the context of CD. Indeed, AIEC pathobiont bacteria seem to be able to impair the anti-inflammatory effects of propionate by creating an infectious niche, leading to gut inflammation. Importantly, these results are relevant to humans since low propionate concentrations were also reported in CD patients colonized by AIEC pathobionts. In addition, by providing key evidence of the importance of SCFAs in intestinal protection, this work lays the groundwork for further studies aiming to correct SCFAs deficiency in CD patients by GPR43 agonist supplementation. In conclusion, our data provide insights for new preventive or curative treatments for CD.

## Methods

### Mice and ethics statement

Mice were maintained under specific-pathogen-free conditions (21–22°C, 12:12-h light-dark cycle) in the animal care facility of the University Clermont Auvergne (Clermont-Ferrand, France). C57BL/6 female mice were purchased from Charles River Laboratories France for reproduction with heterozygotic transgenic CEABAC10 males<sup>49</sup>. Littermates of the >10<sup>th</sup> backcross were used for experimentation. All transgenic CEABAC10 mice used in this study were 5 to 6 weeks old. Animal experiments were performed according to the institutional guidelines approved by the CEMEA Auvergne committee for ethical issues (00730.02).

### Bacterial strain and media

The *E. coli* AIEC strain LF82 was isolated from a chronic ileal lesion of a patient with CD and belongs to *E. coli* serotype O83:H1.<sup>50</sup> *E. coli* LF82 was grown overnight at 37°C in Lysogeny Broth (LB). Amoxicillin (32 mg/L), kanamycin (50 mg/L) and chloramphenicol (25 mg/L) (Sigma-

Aldrich) were added when required. The ability of *E. coli* LF82 to grow with propionate (calcium propionate, Sigma-Aldrich) was tested on minimal medium M9 containing Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (48 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (22 mM), NH<sub>4</sub>Cl (20 mM), MgSO<sub>4</sub> (1 mM), CaCl<sub>2</sub> (0.1 mM), vitamin B12 (cyanocobalamin) (150 nM), vitamin B1 (5 mg/L), and trace metals (0.1 μM ZnSO<sub>4</sub>, 0.045 μM FeSO<sub>4</sub>, 0.2 μM Na<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.2 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 2 μM MnSO<sub>4</sub>, 0.1 μM CuSO<sub>4</sub>, 3 μM CoCl<sub>2</sub> and 0.1 μM NiSO<sub>4</sub>) (2 mL/L). To study the ability of *E. coli* LF82 to degrade propionate (calcium propionate, Sigma-Aldrich), a pre-culture was performed by growing *E. coli* in M9 medium supplemented with 20% LB and 1% bile salts. Cells taken from the pre-culture (10<sup>8</sup> cells per ml) were incubated on minimal medium supplemented with 30 mM propionate and 10 mM glucose (0.025%).

### Construction and transcomplementation of isogenic mutants

*E. coli* LF82 was transformed with pKOBEG, a plasmid encoding the Red proteins that protect linear DNA from degradation in bacteria. The plasmid was maintained in bacteria at 30°C with 25 mg/L chloramphenicol and 1 mM L-arabinose. The F<sub>1</sub> recognition target-flanked cassette harboring the kanamycin resistance cassette was generated by PCR from *E. coli* BW25141 with d-prpC-F/d-prpC-R primers (Table S1) and high-fidelity Platinum Taq polymerase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The PCR products were electroporated in *E. coli* LF82 cells previously washed with glycerol. The resulting LF82ΔprpC isogenic mutant (Km<sup>R</sup>) was selected on Mueller-Hinton agar containing 50 mg/L kanamycin. The replacement of the *prpC* gene by the kanamycin resistance cassette was confirmed by PCR (Table S1). The kanamycin resistance cassette was then removed from LF82ΔprpC bacteria by transient expression of the F<sub>1</sub> recombinase from the pCP20 plasmid, creating the LF82ΔprpC (Km<sup>S</sup>) strain.

The *prpC* gene was amplified by PCR from *E. coli* LF82 genomic DNA by using the NdeIprpC-F and EcoRIprpC-R primers (Table S1). The amplified DNA was purified with a NucleoSpin extraction kit (Macherey-Nagel), digested with NdeI and EcoRI (New England Biolabs), and ligated to the

NdeI-EcoRI-digested expression vector pBK-CMV (Agilent Technologies). This construct was electroporated into LF82 $\Delta$ *prpC* (Km<sup>S</sup>) electrocompetent strain and selected on Mueller-Hinton agar containing 50 mg/L kanamycin. The presence of the *prpC* gene was confirmed by PCR (LF82 $\Delta$ *prpC*:*prpC*). The construct was checked by double-stranded DNA sequencing (GATC biotech, Germany).

### Mouse infection

Several experiments were performed in this study. First, sixteen C57BL/6 transgenic CEABAC10 mice (body weight  $\approx$ 19–24 g) were pretreated by oral administration of fosfomycin in drinking water (2 g/L) for four days to eliminate commensal *E. coli*. Seven days after stopping antibiotic treatment, the animals were orally challenged with  $10^9$  LF82 or LF82 $\Delta$ *prpC* cells for four consecutive days. For experimentation with dextran sodium sulfate-induced colitis, transgenic CEABAC10 mice were provided drinking water with an antibiotic cocktail containing 500 mg/L metronidazole (Sigma-Aldrich), 1 g/L streptomycin (Euromedex), 1 g/L neomycin (Sigma-Aldrich), and 1 g/L ampicillin (Euromedex) for four days to disrupt the normal resident bacterial microbiota in the intestinal tract and to favor the implantation of the LF82 or LF82 $\Delta$ *prpC* strain. The mice received 1% (wt/vol) DSS (molecular mass, 36,000 to 50,000 Da; MP Biomedicals) and, when needed, 0.6% calcium propionate (Sigma-Aldrich) in their drinking water together with the antibiotics. On day 5, the antibiotic treatment was stopped; 0.25% DSS and 0.6% propionate were maintained in the drinking water. On day 6, the mice were orally challenged with  $10^9$  CFUs of the LF82 or LF82 $\Delta$ *prpC* strain or with PBS for four consecutive days.

For GPR43 agonist administration, transgenic CEABAC10 mice received the same antibiotic cocktail in drinking water for 7 days, as described previously. The mice were then continuously exposed to 0.25% (wt/vol) DSS (molecular mass, 36,000 to 50,000 Da; MP Biomedicals) and simultaneously orally infected for 7 days with  $10^9$  CFUs

of AIEC LF82 bacteria and with 5 mg/kg/day GPR43 agonist (Calbiochem, Millipore) dissolved in 50% (1:2) dimethyl sulfoxide (DMSO) or vehicle (50% DMSO).

Mice were weighed daily. Fresh fecal samples (100–200 mg) were collected from individual mice 2 days before and after gavage for determination of propionate level. Fecal samples were collected 2-days post gavage, suspended in phosphate-buffered saline (PBS; Gibco) and plated onto Lysogeny Broth (LB; Conda) agar plates containing ampicillin (100  $\mu$ g/mL; Euromedex) to isolate LF82 bacteria or on LB agar plates containing 50  $\mu$ g/mL kanamycin (Euromedex) to isolate LF82 $\Delta$ *prpC* and incubated at 37°C overnight. Antibiotic susceptibility testing was performed on bacteria in a random manner to confirm whether the isolates were LF82 or LF82 $\Delta$ *prpC*. Two days post infection, mice were euthanized by cervical dislocation. To quantify AIEC bacteria associated with colonic and ileal tissues, intestinal tissues were cut longitudinally, washed in PBS, homogenized in 1 mL of PBS, and plated onto LB agar plates containing 100  $\mu$ g/mL ampicillin or 50  $\mu$ g/mL kanamycin. The severity of colitis was assessed by the disease activity index (DAI) score, which ranges from 0 (healthy) to 12 (high colitic activity) (Table S2).<sup>33</sup>

### Cell culture

The murine macrophage RAW264.7 cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in DMEM supplemented with 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, and 10% fetal bovine serum (DMEMS). For experimental purposes, the cells were harvested in log phase and plated at a density of  $5 \times 10^5$  cells/mL of medium in a 24-well sterile plate. Then, the cells were pretreated for 30 min with incubation medium that was previously filtered (0.45 then 0.22  $\mu$ m) before infection with the LF82 strain (MOI 10).<sup>51</sup> After a 30-min incubation period at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, the medium was replaced with 1 mL of DMEMS medium containing 16  $\mu$ g/mL ciprofloxacin. The next day, cytokines were quantified in the supernatant using an ELISA kit from R&D Systems according to the manufacturer's instructions.

### **Quantification of proinflammatory cytokine release**

Intestinal tissues (1 cm) were placed in RPMI (Gibco) supplemented with antibiotics (50 µg/mL gentamicin (Euromedex) and 1% antibiotic and antimycotic solution X-100 (10,000 U of penicillin, 10 mg of streptomycin and 0.25 mg of amphotericin B per milliliter, PAA)) overnight in a 24-well culture plate in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. All collected supernatants were filtered at 0.22 µm and frozen at –80°C until processing. Proinflammatory mouse cytokines released (IL-6 and KC) were quantified in the filtered culture supernatant by ELISA using kits from R&D systems following the manufacturer's instructions.

### **Quantification of fecal lipocalin-2 (Lcn-2)**

Frozen fecal samples were reconstituted in PBS containing 0.1% Tween 20 (100 mg/mL; Euromedex) and vortexed to obtain a homogenous fecal suspension. These samples were centrifuged for 5 min at 10000 × g and 4°C. Supernatants were collected and stored at –80°C until analysis. ELISAs were performed by using DuoSet® ELISA Development Systems for Lcn-2 from R&D Systems according to the manufacturer's instructions.

### **Microbiological analyses of ileal biopsies and stool samples of CD patients**

Stool samples of CD patients were obtained from a prospective multicenter study. This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki, good clinical practice guidelines and applicable regulatory requirements. The study was approved by the French ethical committee, the so-called "Comité de Protection des Personnes (CPP) Sud-Est 6" – France [AU 904]. In this prospective multicenter study (8 centers), all patients required ileocolonoscopy, regardless of the indication, and were consecutively included between September 2015 and September 2016. In addition to patient characteristics, clinical and endoscopic data were gathered (**Table S3**). Stool samples of CD patients were collected on the day of colonoscopy. Biopsies were taken from the ileum of the patients, focusing on either macroscopically normal or ulcerated areas.

### **Determination of total E. coli number associated with ileal mucosa and in stools**

Ileal biopsies were washed in phosphate-buffered saline (PBS), crushed (Ultra-Turrax, IKA) and incubated for 15 minutes on a tube rotator at room temperature in the presence of Triton 0.1X. Ten-fold dilutions of the lysate were then plated on Drigalski agar to number total *E. coli* colonies after 24 hours of incubation at 37°C. Results are given in colony-forming unit (cfu)/ileal biopsy. Ileal biopsies were carried out using calibrated biopsy forceps to obtain 94 mg of tissue and the number of *E. coli* cfu was determined on the whole biopsy. The stool samples, stored at –80°C in 15% glycerol Minimum Essential Medium (MEM), were crushed in physiological water. Ten-fold dilutions of the homogenate were then plated on Drigalski agar to number total *E. coli* colonies after 24 hours of incubation at 37°C. Results are given in colony-forming unit (cfu)/mg. A random selection of *E. coli* strains was performed on Drigalski plate followed by *E. coli* identification by mass spectrometry.

### **Phenotypical assays to identify AIEC bacteria**

The AIEC characterization was carried out by analyzing their abilities to adhere to and invade intestinal epithelial cell lines, as well as survive and replicate within macrophage cell lines, by conducting gentamicin protection assays with intestine-407 epithelial cells (ATCC, CCL-6) and THP-1 macrophages (ATCC, TIB-202), as previously described.<sup>23</sup>

### **Extraction of propionate from fecal samples**

Mouse fecal samples were frozen at –20°C immediately after collection. For each mouse, fecal samples collected over 2 days before or after gavage with *E. coli* strains were pooled. Stool samples of CD patients from the previously described prospective multicenter study were used. Human and mouse samples were weighed and suspended in 1 mL of water with 0.5% phosphoric acid per 0.5 g of sample. Fecal suspensions were homogenized with vortexing for approximately 2 min and centrifuged for 10 min at 10000 × g.

The extraction procedure for short-chain fatty acids was adapted from the method previously been validated by Hoving et al.<sup>52</sup> and García-Villalba

et al.<sup>53</sup> Simultaneous analyses of acetate and propionate were prepared by spiking 125  $\mu\text{L}$  of internal standard (4-methylvaleric acid (MVA) at 200 mg/L) into 300  $\mu\text{L}$  of biological sample. Derivatization of short-chain fatty acids was performed with 2,3,4,5,6-pentafluorobenzylbromide (PFBBBr) at pH 6.8 with phosphate buffer for 1 hour at 60°C. Then, sample solutions were extracted with 200  $\mu\text{L}$  of hexane. The upper organic layer was collected and transferred directly into chromatography vials for injection prior to analysis by gas chromatography.

#### **Quantification of propionate by gas chromatography and mass spectrometry**

Analyses were performed on an HP5973 MS with an HP6890 series GC (Agilent Technologies, Atlanta, GA, USA). Automatic injections were performed using an HP6890 autosampler. The temperatures of the injector and the transfer line detector were 180°C and 280°C, respectively. The GC was operated in splitless injection mode with a constant flow of 1 ml/min of helium through the HP-5 MS column (30 m  $\times$  0.25 mm i.d. with 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness (J&W, Folsom, CA)). The GC oven temperature was programmed to start at 70°C, increasing first to 150°C at 20°C/min and then to 290°C at 30°C/min. The retention times were 3.39 min, 3.93 min and 5.35 min for acetate, propionate and MVA, respectively. Ions were detected by selective ion monitoring (SIM) for quantification (Q) and confirmation (q): m/z 240 (Q), 197 and 181 (q) for acetate; m/z 254 (Q), 197 and 181 (q) for propionate; and m/z 97 (Q), 57 and 115 (q) for MVA. Identification of the target compound was carried out by comparing the retention time and m/z ratio with those of the standards. HP Chemstation software was used to control the equipment and carry out the data processing. The concentrations of acetate and propionate in the biological samples were determined based on their area ratios to that of the IS using a weighted quadratic fit. The lower limit of quantification (LLOQ) for each compound was 5 mg/L, and the upper limit of quantification (ULOQ) was 1000 mg/L in biological samples without dilution.

#### **RNA-extraction and RT-qPCR**

Total RNA from CEABAC10 colonic mucosa was extracted using Trizol reagent following the manufacturer's instructions. Briefly, 1 cm of colonic mucosa was homogenized in liquid nitrogen using mortar and pestle. The resulting powder was suspended in 1 ml Trizol reagent (Life Technologies) and 200  $\mu\text{L}$  of chloroform were added. The tubes were vortexed and spin at 12,000 g for 10 min at 4°C. The aqueous phase was transferred into a new tube and 500  $\mu\text{L}$  of isopropanol were added for 30 min at RT for RNA precipitation. The tubes were spun at 12,000 g for 10 min at 4°C and the pellet containing RNA was washed twice with 70% ethanol. The pellet was suspended in 50  $\mu\text{L}$  RNase-free water. The RNA quality was assessed by bioanalyzer and their concentration was determined by fluorimeter Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) for RT-qPCR or mRNA-sequencing. mRNA were reverse transcribed using PrimeScript RT Reagent kit (Takara) following the manufacturer's instructions. After cDNA dilution (1/10), 1  $\mu\text{L}$  of cDNA was used as a template for qPCR quantification (iQ Taq Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad). *Hprt* gene (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) was used as an endogenous control to normalize the target gene expression. For analysis, the fold change for the target gene was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method after normalization to controls. Specific primer sequences used are listed in Supplementary Table S1 and each primer pair was designed on two different exons to span a large intronic region.

#### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism V.7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) software package for PC. For all data displayed in graphs, values are expressed as the mean  $\pm$  SEM or median. Data comparisons between two groups were performed using a two-tailed Student's t-test analysis or a Mann-Whitney U-test depending on the normality test using the Kolmogorov-Smirnov test. A non-parametric Friedman test was applied to assess differences in propionate concentration before and after infection. When appropriate, a one-way ANOVA with



the Bonferroni post hoc test was performed. Spearman correlation analysis was performed between the propionate concentration and number of *E. coli* in pairwise comparisons. Differences corresponding to *P* values  $\leq 0.05$  were considered statistically significant.

## Acknowledgments

This study was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie; Inserm (UMR 1071); INRAe (USC-2018), Région Auvergne Rhône Alpes; the French government's IDEX-I-SITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25) of the University of Clermont Auvergne; the National Program "Microbiote" Inserm; and Association François Aupetit (AFA). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. We thank Sylvine Batista for providing technical assistance.

## ORCID

Damien Richard  <http://orcid.org/0000-0002-0160-3781>

Anthony Buisson  <http://orcid.org/0000-0002-6347-409X>

## References

- Bolognini D, Tobin AB, Milligan G, Moss CE. The Pharmacology and Function of Receptors for Short-Chain Fatty Acids. *Mol Pharmacol*. 2016;89:388–398. doi:10.1124/mol.115.102301.
- Hill MJ. Bacterial fermentation of complex carbohydrate in the human colon. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP*. 1995;4:353–358. doi:10.1097/00008469-199510000-00004.
- D'Argenio G, Mazzacca G. Short-chain fatty acid in the human colon. Relation to inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Adv Exp Med Biol*. 1999;472:149–158.
- Huang N, Wu GD. Short chain fatty acids inhibit the expression of the neutrophil chemoattractant, interleukin 8, in the Caco-2 intestinal cell line. *Adv Exp Med Biol*. 1997;427:145–153.
- Meijer K, de Vos P, Priebe MG. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010;13:715–721. doi:10.1097/MCO.0b013e32833eebe5.
- Yang G, Chen S, Deng B, Tan C, Deng J, Zhu G, Yin Y, Ren W. Implication of G protein-coupled receptor 43 in Intestinal Inflammation: a mini-review. *Front Immunol* [Internet] 2018 [cited 2020 Jan 13]; 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01434/full>.
- Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, Harmsen HJM, Faber KN, Hermoso MA. Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Front Immunol*. 2019;10:277. doi:10.3389/fimmu.2019.00277.
- Tong L, Wang Y, Wang Z, Liu W, Sun S, Li L, Su D, Zhang L. Propionate ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis by improving intestinal barrier function and reducing inflammation and oxidative stress. *Front Pharmacol*. [Internet] 2016 [cited 2017 Jul 21]; 7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4983549/>
- Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, Muir AI, Wigglesworth MJ, Kinghorn I, Fraser NJ, et al. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem*. 2003;278(13):11312–11319. doi:10.1074/jbc.M211609200.
- Ang Z, Er JZ, Ding JL. The short-chain fatty acid receptor GPR43 is transcriptionally regulated by XBP1 in human monocytes. *Sci Rep*. 2015;5:1–9. doi:10.1038/srep08134.
- Nilsson NE, Kotarsky K, Owman C, Olde B. Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;303:1047–1052.
- Poul EL, Loison C, Struyf S, Springael J-Y, Lannoy V, Decobecq M-E, Brezillon S, Dupriez V, Vassart G, Damme JV, et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem*. 2003;278:25481–25489. doi:10.1074/jbc.M301403200.
- Ang Z, Ding JL. GPR41 and GPR43 in obesity and inflammation - protective or causative? *Front Immunol*. 2016;7:28. doi:10.3389/fimmu.2016.00028.
- Bajic D, Niemann A, Hillmer A-K, Mejias-Luque R, Bluemel S, Docampo M, Funk MC, Tonin E, Boutros M, Schnabl B, et al. Gut microbiota derived propionate regulates the expression of Reg3 mucosal lectins and ameliorates experimental colitis in mice. *J Crohns Colitis*. 2020;14:1462–1472. doi:10.1093/ecco-jcc/jjaa065.
- Takaishi H, Matsuki T, Nakazawa A, Takada T, Kado S, Asahara T, Kamada N, Sakuraba A, Yajima T, Higuchi H, et al. Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Int J Med Microbiol*. 2008;298:463–472. doi:10.1016/j.ijmm.2007.07.016.
- Ferrer-Picón E, Dotti I, Corraliza AM, Mayorgas A, Esteller M, Perales JC, Ricart E, Masamunt MC, Carrasco A, Tristán E, et al. intestinal inflammation modulates the epithelial response to butyrate in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2020;26:43–55.



17. Svolos V, Hansen R, Nichols B, Quince C, Ijaz UZ, Papadopoulou RT, Edwards CA, Watson D, Alghamdi A, Brejnrod A, et al. Treatment of active Crohn's Disease with an ordinary food-based diet that replicates exclusive enteral nutrition. *Gastroenterology*. 2019;156:1354–1367.e6. doi:10.1053/j.gastro.2018.12.002.
18. Zhou Y, Zhi F. Lower level of bacteroides in the gut microbiota is associated with inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *BioMed Res Int*. 2016;2016:5828959. doi:10.1155/2016/5828959.
19. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:313–323.
20. Lee YK, Mehrabian P, Boyajian S, Wu W-L, Selicha J, Vonderfecht S, Mazmanian SK. The protective role of *Bacteroides fragilis* in a murine model of colitis-associated colorectal cancer. *mSphere*. 2018;3(6):e00587-18. doi:10.1128/mSphere.00587-18
21. Tan H, Zhao J, Zhang H, Zhai Q, Chen W. Novel strains of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides ovatus* alleviate the LPS-induced inflammation in mice. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103:2353–2365. doi:10.1007/s00253-019-09617-1.
22. Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, Yantiss R, Orsi RH, Wiedmann M, McDonough P, Kim SG, et al. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *Isme J*. 2007;1:403–418. doi:10.1038/ismej.2007.52.
23. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser A-L, Barnich N, Bringer M-A, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel J-F. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004;127:412–421. doi:10.1053/j.gastro.2004.04.061.
24. Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S, Krause DO. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2007;56:669–675. doi:10.1136/gut.2006.099796.
25. Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, Englyst H, Williams HF, Rhodes JM. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology*. 2004;127:80–93. doi:10.1053/j.gastro.2004.03.054.
26. Martinez-Medina M, Garcia-Gil LJ. *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: an update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2014;5:213–227. doi:10.4291/wjgp.v5.i3.213.
27. Palmela C, Chevarin C, Xu Z, Torres J, Sevrin G, Hirten R, Barnich N, Ng SC, Colombel J-F. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2018;67:574–587.
28. Delmas J, Gibold L, Faïs T, Batista S, Lereboure M, Sinel C, Vazeille E, Cattoir V, Buisson A, Barnich N, et al. Metabolic adaptation of adherent-invasive *Escherichia coli* to exposure to bile salts. *Sci Rep*. 2019;9:2175. doi:10.1038/s41598-019-38628-1.
29. Kitamoto S, Alteri CJ, Rodrigues M, Nagao-Kitamoto H, Sugihara K, Himpl SD, Bazzi M, Miyoshi M, Nishioka T, Hayashi A, et al. Dietary l -serine confers a competitive fitness advantage to *Enterobacteriaceae* in the inflamed gut. *Nat Microbiol*. 2020;5:116–125.
30. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients*. 2011;3:858–876. doi:10.3390/nu3100858.
31. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Hatanaka E, Sato FT, Sampaio SC, Curi R. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *J Nutr Biochem*. 2011;22:849–855. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.07.009.
32. Drouet M, Vignal C, Singer E, Djouina M, Dubreuil L, Cortot A, Desreumaux P, Neut C. AIEC colonization and pathogenicity: influence of previous antibiotic treatment and preexisting inflammation. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18:1923–1931. doi:10.1002/ibd.22908.
33. Carvalho FA, Barnich N, Sauvanet P, Darcha C, Gelot A, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease-associated *Escherichia coli* LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:1051–1060. doi:10.1002/ibd.20423.
34. Park J-H, Kotani T, Konno T, Setiawan J, Kitamura Y, Imada S, Usui Y, Hatano N, Shinohara M, Saito Y, et al. Promotion of Intestinal Epithelial Cell Turnover by Commensal Bacteria: role of Short-Chain Fatty Acids. *PloS One*. 2016;11:e0156334. doi:10.1371/journal.pone.0156334.
35. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, Glickman JN, Garrett WS. The microbial metabolites, short chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. [Internet] 2013 [cited 2020 Jan 24]; 341. Available from. ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3807819/>
36. Agus A, Massier S, Darfeuille-Michaud A, Billard E, Barnich N. Understanding host-adherent-invasive *Escherichia coli* interaction in Crohn's disease: opening up new therapeutic strategies. *BioMed Res Int*. 2014;2014:567929. doi:10.1155/2014/567929.
37. Huda-Faujan N, Abdulamir AS, Fatimah AB, Anas OM, Shuhaimi M, Yazid AM, Loong YY. The impact of the level of the intestinal short chain fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects. *Open Biochem J*. 2010;4:53–58. doi:10.2174/1874091X01004010053.
38. Cabré E, Domènech E. Impact of environmental and dietary factors on the course of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2012;18:3814–3822. doi:10.3748/wjg.v18.i29.3814.

39. Tedelind S, Westberg F, Kjerrulf M, Vidal A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol WJG*. 2007;13:2826–2832. doi:10.3748/wjg.v13.i20.2826.
40. Briel JW, Zimmerman DD, Boer LMD, Kwast THVD, Schouten WR. Short-chain fatty acid irrigation in the treatment of diversion colitis. A prospective double-blind randomized study. *Gastroenterology*. 2000;118:A580–1. doi:10.1016/S0016-5085(00)84460-1.
41. Guillemot F, Colombel JF, Neut C, Verplanck N, Lecomte M, Romond C, Paris JC, Cortot A. Treatment of diversion colitis by short-chain fatty acids. *Dis Colon Rectum*. 1991;34:861–864. doi:10.1038/nature08530.
42. Harig JM, Soergel KH, Komorowski RA, Wood CM. Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. *N Engl J Med*. 1989;320:23–28. doi:10.1056/NEJM198901053200105.
43. Ormsby MJ, Johnson SA, Carpena N, Meikle LM, Goldstone RJ, McIntosh A, Wessel HM, Hulme HE, McConnachie CC, Connolly JPR, et al. Propionic acid promotes the virulent phenotype of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Cell Rep*. 2020;30:2297–2305.e5.
44. Ormsby MJ, Logan M, Johnson SA, McIntosh A, Fallata G, Papadopoulou R, Papachristou E, Hold GL, Hansen R, Ijaz UZ, et al. Inflammation associated ethanolamine facilitates infection by Crohn's disease-linked adherent-invasive *Escherichia coli*. *EBioMedicine*. 2019;43:325–332. doi:10.1016/j.ebiom.2019.03.071.
45. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013;504:446–450.
46. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, Schilter HC, Rolph MS, Mackay F, Artis D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461:1282–1286.
47. Carvalho FA, Barnich N, Sivignon A, Darcha C, Chan CHF, Stanners CP, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J Exp Med*. 2009;206:2179–2189. doi:10.1084/jem.20090741.
48. Agus A, Denizot J, Thévenot J, Martinez-Medina M, Massier S, Sauvanet P, Bernalier-Donadille A, Denis S, Hofman P, Bonnet R, et al. Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. *Sci Rep*. 2016;6:19032.
49. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A, Colombel J-F. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1998;115:1405–1413. doi:10.1016/S0016-5085(98)70019-8.
50. Chan CHF, Stanners CP. Novel mouse model for carcinoma embryonic antigen-based therapy. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2004;9:775–785.
51. Liu T, Li J, Liu Y, Xiao N, Suo H, Xie K, Yang C, Wu C. Short-chain fatty acids suppress lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines through inhibition of NF- $\kappa$ B pathway in RAW264.7 cells. *Inflammation*. 2012;35:1676–1684. doi:10.1007/s10753-012-9484-z.
52. Hoving LR, Heijink M, van Harmelen V, van Dijk KW, Giera M. GC-MS Analysis of Short-Chain Fatty Acids in Feces, Cecum Content, and Blood Samples. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2018;1730:247–256.
53. García-Villalba R, Giménez-Bastida JA, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA, Carlos Espín J, Larrosa M. Alternative method for gas chromatography-mass spectrometry analysis of short-chain fatty acids in faecal samples. *J Sep Sci*. 2012;35:1906–1913. doi:10.1002/jssc.201101121.

Methyl-donor supplementation prevents intestinal  
colonization by Adherent-Invasive *E. coli* in a mouse  
model of Crohn's disease

Gimier, E., Chervy, M., Agus, A., Sivignon, A., Billard, E., Privat, M., Viala, S., Minet-  
Quinard, R., Buisson, A., Vazeille, E., Barnich, N., & Denizot, J.

2020

Scientific Reports



OPEN

# Methyl-donor supplementation prevents intestinal colonization by Adherent-Invasive *E. coli* in a mouse model of Crohn's disease

Elodie Gimier<sup>1</sup>, Mélissa Chervy<sup>1</sup>, Allison Agus<sup>1,7</sup>, Adeline Sivignon<sup>1</sup>, Elisabeth Billard<sup>1</sup>, Maud Privat<sup>2,3</sup>, Sandrine Viala<sup>2,3</sup>, Régine Minet-Quinard<sup>4,5</sup>, Anthony Buisson<sup>1,6</sup>, Emilie Vazeille<sup>1,6</sup>, Nicolas Barnich<sup>1</sup> & Jérémy Denizot<sup>1</sup>✉

Deficiencies in methyl-donor molecules (folate, B12 vitamin), DNA methylation alteration and high prevalence of Adherent-Invasive *Escherichia coli* (AIEC) are frequently observed in Crohn's disease (CD) patients. AIEC bacteria adhere to the enterocytes through abnormally expressed carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) glycoprotein on host cells. This work aims at studying the relationship between methyl-donor molecules and AIEC-induced intestinal inflammatory response. CEABAC10 mice, a mouse model of CD, were fed a control or Methyl-donor Supplemented diet (MS diet). *CEACAM6* promoter was hypermethylated in intestinal epithelial cells from mice fed an MS diet, which was associated with a significant decrease in *CEACAM6* expression. Transcriptomic analysis revealed increased expression of anti-microbial peptides, increase in HSP70 gene family expression and a decreased expression of inflammatory marker Calprotectin upon MS diet, associated to a lower ability of AIEC bacteria to colonize gut mucosa. We observed in a cohort of CD patients that serum folate concentration was inversely correlated to Crohn's disease endoscopic index of severity and to fecal inflammatory markers. This study demonstrates that methyl-donor supplementation through the diet induces a specific intestinal micro-environment limiting pathobiont colonization of the gut. Clinicians may wish to consider methyl-donor supplementation for methyl-donor deficient CD patients.

## Abbreviations

AIEC	Adherent-Invasive <i>Escherichia coli</i>
BSA	Bovine serum albumin
CD	Crohn's disease
CDEIS	Crohn's disease endoscopic index of severity
CEABAC10	Carcinoembryonic antigen bacterial artificial chromosome 10
CEACAM	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule
FBS	Fetal bovine serum

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, Inserm U1071; USC-INRAE 2018, Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte (M2iSH), 28 Place Henri Dunant, 63001 Clermont-Ferrand, France. <sup>2</sup>U1240 Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, Université Clermont Auvergne, INSERM, 63000 Clermont-Ferrand, France. <sup>3</sup>Département d'Oncogénétique, Centre Jean Perrin, 63000 Clermont-Ferrand, France. <sup>4</sup>Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, CHU Clermont-Ferrand, 63000 Clermont-Ferrand, France. <sup>5</sup>CNRS UMR 6293, INSERM U1103, GReD, Université Clermont Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France. <sup>6</sup>Service d'Hépatogastro-Entérologie, 3iHP, CHU Clermont-Ferrand, 63000 Clermont-Ferrand, France. <sup>7</sup>Present address: Micalis Institute, Institut National de la Recherche Agronomique (INRAE), AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78352 Jouy-en-Josas, France. ✉email: jeremy.denizot@uca.fr

FITC	Isothiocyanate fluorescein
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IL-6	Interleukin-6
KC	Keratinocyte Chemoattractant
kDa	KiloDalton
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes
Lcn-2	Lipocalin-2
MS diet	Methyl-supplemented diet
SIgA	Secretory Immunoglobulin A
WT	Wild type

Crohn's Disease (CD), an Inflammatory Bowel Disease (IBD), is a chronic inflammatory disorder of the gastrointestinal tract, affecting 2 million people in Europe with a rising incidence in newly industrialized countries<sup>1</sup>. Its etiology involves environmental factors, like the western lifestyle, genetic and microbial factors, leading to abnormal immune response of intestinal mucosa<sup>2,3</sup>. Recently, studies have highlighted alteration of DNA methylation in CD patients, which could be one of the missing links between intestinal inflammatory phenotype in CD patients and environmental factors. During the last decade, specific attention was given to the study of DNA methylation in IBD patients' blood cells and intestinal epithelial cells, all showing differentially methylated CpG sites in CD patients, when compared to controls<sup>4–13</sup>. DNA methylation occurs within the one-carbon metabolism pathway and is dependent on several enzymes (dihydrofolate reductase, methylene-tetrahydrofolate reductase, methionine synthase) and on the availability of micronutrients used as cofactors such as folate (B9 vitamin), B12 vitamin (methionine synthase cofactor), methionine, choline and betaine. Folate enters the one-carbon metabolism cycle where it is converted, as a result of many enzymatic reactions, into S-adenosyl-methionine used as a methyl-donor by DNA Methyltransferase (DNMT) enzymes to catalyze the DNA methylation reaction<sup>14</sup>. The level of folate and other methyl-donor molecules intake through the diet were associated to the regulation of DNA methylation. Even more significantly, serum B12 and folate (B9) deficiencies have frequently been noticed in different cohorts of IBD patients<sup>14–20</sup>. Based on the known roles of these molecules in one-carbon metabolism, epigenetic modifications such as DNA methylation profiles and modified genes expression observed in CD patients could be the result, in part, of methyl-donor molecules deficiencies.

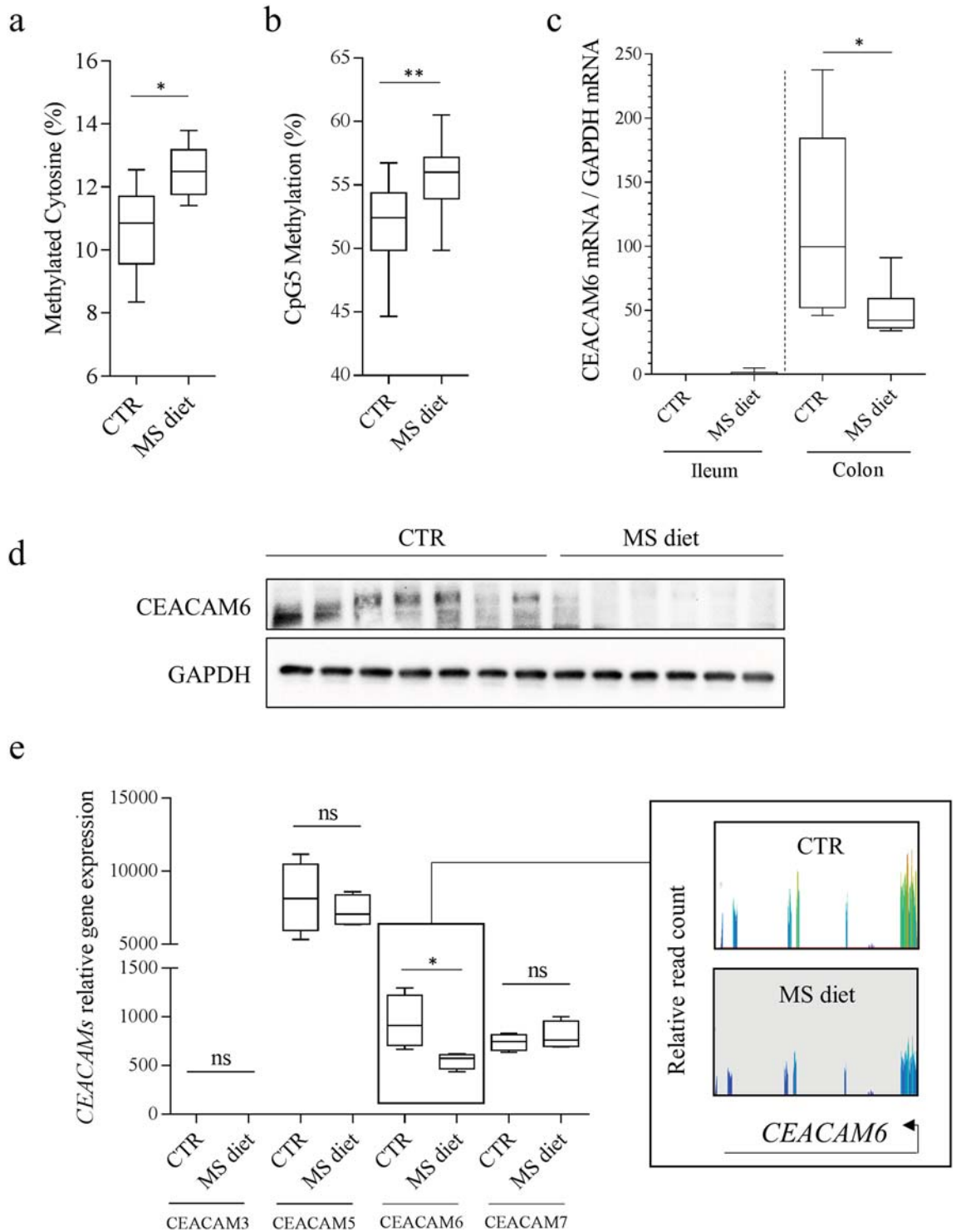
A high prevalence of invasive *Escherichia coli* strains (21–63% of CD patients), designated as the pathotype Adherent-Invasive *E. coli* (AIEC), has been detected in the ileal mucosa of CD patients in many studies worldwide<sup>21–26</sup>. These bacteria induce secretion of pro-inflammatory cytokines and intestinal inflammation in a genetically susceptible mouse model<sup>27</sup>. AIEC can adhere to and invade intestinal epithelial cells (IECs), through the interaction with the abnormally over-expressed mannosylated CEACAM6 protein in IECs of CD patients<sup>28,29</sup>. We used the CEABAC10 mouse model to study AIEC intestinal colonization in vivo. This transgenic mouse model carries 4 human CEACAMs genes (*CEACAM3*, *CEACAM5*, *CEACAM6* and *CEACAM7*) under the control of their human promoter. As previously described by our group, AIEC bacteria highly colonize the gut mucosa of these mice in comparison to WT mice, showing that this mouse model is appropriate to mimic AIEC colonization in CD<sup>27,30</sup>. We previously highlighted a DNA methylation-dependent regulation of *CEACAM6* gene transcription. Methylation of a specific CpG within the *CEACAM6* gene promoter impairs HIF-1 transcription factor binding, controlling the transcription of the gene<sup>31</sup>. As CD patients frequently present defects in methyl-donor molecules and in DNA methylation pattern, one strategy to limit AIEC colonization could be to restore the methylation pattern of *CEACAM6* (and other misregulated genes) to decrease its expression through diet-based strategy by increasing intake in methyl-donor molecules. Our hypothesis is that methyl-donor supplementation, such as folate and B12 vitamin could modulate gene expression in IECs, decrease *CEACAM6* gene expression and, therefore, prevent AIEC colonization and subsequent inflammation.

Methyl-donor enriched or deficient diets have been used in many research contexts. These studies have genuinely demonstrated that maternal-methyl-donor supplementation increases DNA methylation in the offspring and sensitivity of mice to DSS-induced colitis<sup>32–35</sup>. In contrast, methyl-donor deficiency leads to a decrease in DNA methylation associated to a weaker intestinal barrier function and also leads to an increase in the sensitivity of rats to DSS-induced colitis, suggesting a central role of methyl-donor molecules during the course of inflammation<sup>36–38</sup>. However, no studies have analyzed the effect of a methyl-supplemented diet during CD-associated pathobiont bacterial challenge. Our hypothesis is that a methyl-donor supplementation through the diet could limit AIEC bacteria intestinal colonization in the well-established CEABAC10 mouse model of CD through the modulation of DNA methylation. This study establishes a relationship between methyl-donor molecules and intestinal inflammation in the context of AIEC colonization and in a cohort of CD patients.

## Results

**Addition of methyl-donor molecules in the diet decreases CEACAM6 gene expression.** Adherent-Invasive *E. coli* are frequently found in ileal lesions in CD patients and use CEACAM6 as a receptor for their adhesion and entry within IECs. *CEACAM6* was previously identified as a gene regulated by DNA methylation on a specific CpG site (named CpG5) within a Hypoxia Inductible Factor (HIF)-1 Responsive Element<sup>31</sup>. Mice were fed a diet enriched in methyl-donor molecules [Methyl-donor Supplemented diet (MS diet)] to increase global DNA methylation in intestinal epithelial cells, as previously described<sup>32,33</sup>. As expected, we observed a significant increase in the proportion of methylated cytosine on LINE (Long Interspersed Nuclear Element) in colonic mucosa from mice fed an MS diet, compared to mice fed the control diet (CTR diet) (CTR: 10.68%; MS diet: 12.48%  $p=0.0488$ ,  $n=5$ ) (Fig. 1a). Then, we specifically assessed the effect of MS diet on *CEACAM6* promoter methylation and gene expression in intestinal mucosa of mice receiving a control diet or an MS diet





**Figure 1.** Methy-donor supplementation decreases *CEACAM6* expression through hypermethylation of its promoter in intestinal epithelial cells in vivo. **(a)** Cytosine methylation levels on LINE elements from colonic mucosa of mice fed a control (CTR) or Methyl-Supplemented diet (MS diet). **(b)** Methylation level of CpG5 (within HIF-1 responsive element) within *CEACAM6* promoter was measured on purified enterocytes from mice fed a control diet (CTR) (n = 12) and MS diet (n = 10) using Bisulfite-SnapShot. **(c)** *CEACAM6* mRNA was quantified by RT-qPCR in ileal and colonic mucosa (n = 4). **(d)** Western blot performed on colonic mucosa of CEABAC10 mice fed a CTR or MS diet for quantification of *CEACAM6* expression (n = 7 and 6 respectively). The two signals were obtained from the same gel migration. The membrane was cropped as the anti-*CEACAM6* antibody was made in mice; hence the secondary antibody recognizes the heavy and light chains of endogenous IgG, masking the *CEACAM6* signal. Uncropped membranes are shown in Supplementary Figure S1. **(e)** *CEACAMs* genes expression encoded by the CEABAC transgene was measured in colonic mucosa from mice fed a control diet (CTR) (n = 4 biological replicates) and MS diet (n = 4 biological replicates) by RNA-seq. Insert: Screen-shot of quantified *CEACAM6* reads from RNA-seq data. Mann-Whitney test. ns non-significant. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

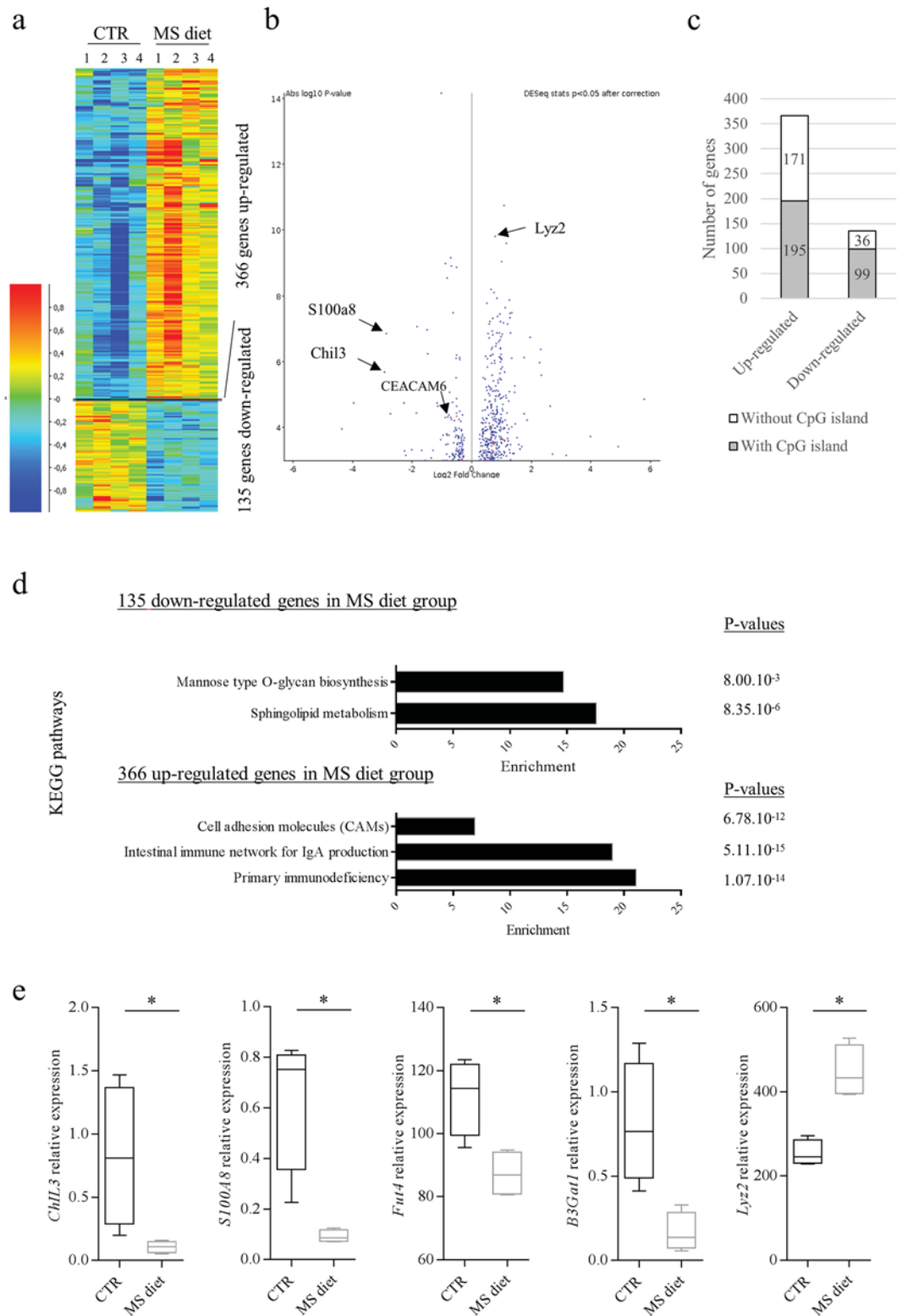
by Bisulfite-SnapShot, RT-qPCR, western blot and RNA-seq. We observed an increase in CpG5 methylation level (which is found in a binding site for HIF-1 transcription factor<sup>31</sup>) in colonic mucosa of mice fed an MS diet when compared to mice fed a control diet ( $p=0.010$ ) (Fig. 1b). RT-qPCR analysis showed a significant decrease in *CEACAM6* mRNA level in colonic mucosa of CEABAC10 mice fed an MS diet, compared to mice fed a control diet (mean CTR: 114.4,  $n=5$ ; mean MS diet: 49.15,  $n=6$  ANOVA,  $p<0.05$ ) (Fig. 1c). This observation was confirmed by western blot (Fig. 1d and Supplementary Figure S1). Interestingly, RNA-seq analysis revealed no change in the expression levels of three of the genes encoded by the transgene (humans *CEACAM3*, *CEACAM5* and *CEACAM7*) in intestinal mucosa from CEABAC10 mice fed an MS diet. A significant 1.72-fold decrease in *CEACAM6* expression in intestinal mucosa of mice fed an MS diet was observed, compared to mice fed the conventional diet ( $p=0.029$ ) (Fig. 1e). Taken together, these observations reveal that methyl-donor molecules supplementation in the diet could decrease *CEACAM6* gene expression in vivo, which could be of interest in the treatment of Enterobacteria-colonized CD patients.

**RNA-seq analysis indicates a protective gene expression profile upon MS diet feeding in colonic mucosa.** To assess global changes in gene expression in response to MS diet, we performed RNA-seq analysis on colonic mucosa from mice fed a control diet and mice fed an MS diet. DeSeq2 statistical analysis identified 135 genes as significantly down-regulated and 366 genes as significantly up-regulated in mice fed an MS diet compared to mice fed a control diet ( $p<0.05$ ,  $n=4$ ) (Fig. 2a, b). Interestingly, among the 135 down-regulated genes, 73.3% (99 genes) are known as regulated by a CpG island in their promoter whereas among the 366 up-regulated, 53.3% of them are regulated by a CpG island in their promoter (Fig. 2c). These data suggest that MS diet preferentially leads to a decrease in expression of genes harboring a CpG island within their promoter, as expected. Among the 135 down-regulated genes, gene ontology analysis associated these genes to two pathways as sphingolipid metabolism and mannose-O-glycan biosynthesis (*Fut4*, *B3Gat1*), which could lead to modifications of glycosylation of intestinal mucosal surface (Fig. 2d, e and Supplementary Tables S1 and S3). A down-regulation of Calprotectin subunits S100a8 and S100a9 (markers of inflammation) appeared in mice fed an MS diet though, which confirms an obvious relationship between methyl-donor molecules and the regulation of pro-inflammatory markers expression (Fig. 2b, e). In contrast, among the 366 up-regulated genes, antibacterial genes such as *Lyz1* and *Lyz2* were identified, suggesting a potential better ability of intestinal mucosa to counteract bacterial infection (Fig. 2b, e and Supplementary Tables S2 and S3). Interestingly, we observed an increased expression of heat-shock protein genes HSPA1A and HSPA1B, members of HSP70 family, upon MS diet feeding (Supplementary Table S2). These genes have clearly been shown as protective against intestinal inflammation in different models (see discussion section). It is worth to note that 15 of the up-regulated genes were associated to “Intestinal immune network for Secretory IgA (SIgA) production” ( $p$  value =  $5.11 \times 10^{-15}$ , enrichment = 20.2) (Fig. 2d). RNA-seq revealed a 1.55 fold increase in the J chain gene expression ( $p=9.52 \times 10^{-5}$ ), which contributes to the formation and secretion of Secretory Immunoglobulin A (SIgA), in mice fed an MS diet. A higher secretion of SIgA within colonic lumen of MS diet-fed mice could therefore modify intestinal microbiota composition and could favor elimination of pathogenic/pathobiont bacteria, such as AIEC in CD patients.

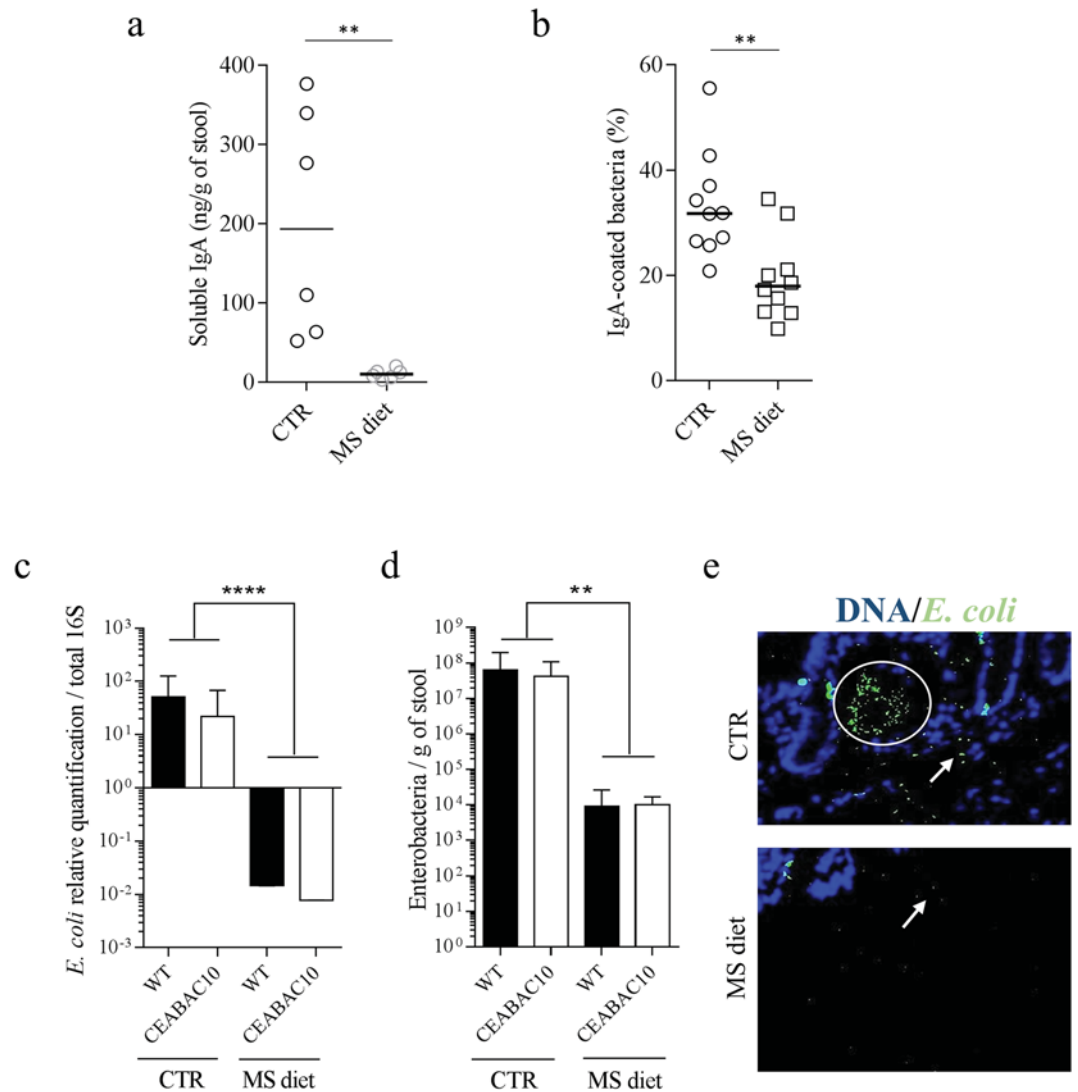
**MS diet impacts IgA concentration in the lumen.** To analyze the relevance of RNA-seq data, we quantified the SIgA concentration in the stools of mice fed a control diet and an MS diet. In contrast to what we expected, based on RNA-seq data, we observed a huge decrease in SIgA quantity in the stools of CEABAC10 mice fed an MS diet (CTR: 203.20 ng/g; MS diet: 10.50 ng/g,  $p=0.022$ ,  $n=6$ ) (Fig. 3a). Then, we analyzed the proportion of SIgA-coated bacteria in the stools of mice fed the control or the MS diet using flow cytometry. SIgA-coated bacteria were stained with an anti-SIgA antibody coupled to PE fluorochrome. We observed a significant decrease in the proportion of SIgA-coated bacteria in mice fed an MS diet compared to control diet (CTR mean: 33.36% vs MS diet 19.49%;  $p=0.004$ ) (Fig. 3b). These data suggest that MS diet leads to a fewer number of SIgA-coated bacteria in the microbiota, which could be a response to drastic changes in microbiota composition upon MS diet feeding.

**MS diet prevents commensal *E. coli* overgrowth in colonic mucosa.** As we observed a decrease in glycosylation pathways (essential for bacterial growth and attachment), and a decrease in SIgA secretion upon MS diet feeding, we analyzed the fecal *E. coli* load in mice fed a control diet or an MS diet. qPCR approach revealed a  $3.3 \times 10^3$ -fold decrease in *E. coli* population in mice fed an MS diet when compared to mice fed a control diet ( $p<0.001$ ) (Fig. 3c). These molecular data were confirmed by cultural approach by quantification of Enterobacteria on Drigalsky agar plate (selective for Gram negative bacteria) where we observed a  $5.8 \times 10^3$ -fold decrease in Enterobacteria load in mice fed an MS diet ( $p=0.003$ ), independently of the genotype of the mice (Fig. 3d). Immunostaining on colonic section confirmed these observations. Very few *E. coli* were observed associated to colonic mucosa or in the lumen of MS diet-fed mice whereas *E. coli* population was abundant in control diet-fed mice (Fig. 3e).

**MS diet protects against pathobiont AIEC infection in vivo.** As we observed that MS diet decreases commensal *E. coli* bacteria in the gut microbiota, and decreases AIEC receptor *CEACAM6* gene expression, we hypothesized that MS diet could prevent pathobiont AIEC bacteria encroachment and subsequent inflammation by inducing a specific intestinal micro-environment. To test this hypothesis, control or MS diet-fed CEABAC10 mice were orally challenged by AIEC reference strain LF82 (Fig. 4a). AIEC LF82 count in the stools did not reveal any differences between the both groups at day 1 post-infection. In contrast, we observed a significant 2.55-fold ( $p=0.031$ ) and a 2.57-fold ( $p=0.009$ ) decrease in AIEC load in MS diet-fed mice compared to control diet-fed ones 2 and 3 days post infection, respectively (Fig. 4b). Nevertheless, no difference was observed in the



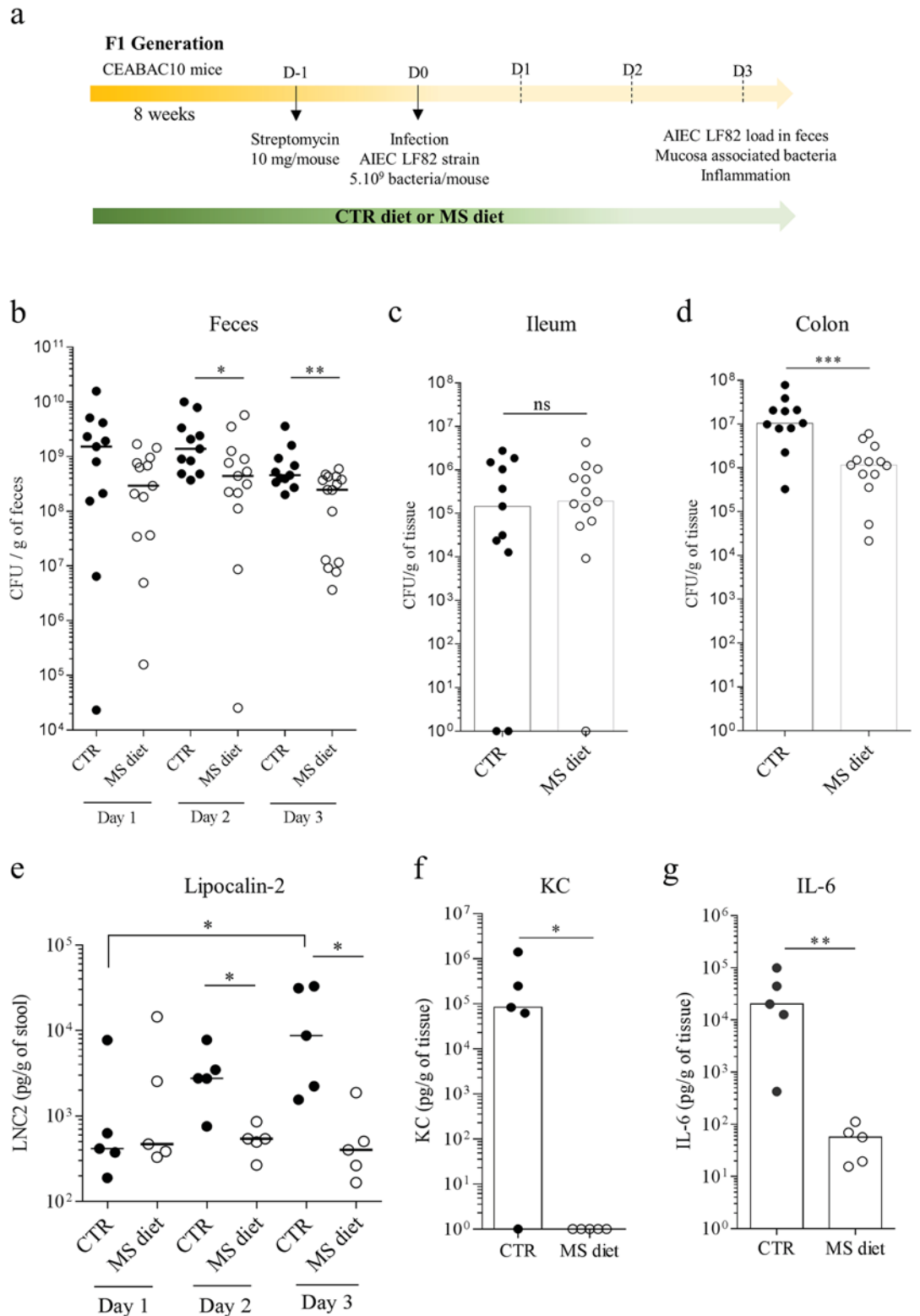
**Figure 2.** Transcriptomic profile of colonic mucosa upon MS diet feeding. mRNA-seq was performed on RNA from colonic mucosa (n = 4 for CTR, n = 4 for MS diet). **(a)** Heat-map showing the differentially expressed genes between the both groups (DeSeq2 stat, p < 0.05). **(b)** Volcano plot showing the significantly misregulated genes in MS diet, compared to control diet. **(c)** Number of misregulated genes harboring CpG islands within their promoter. **(d)** KEGG pathways analysis of up- and down-regulated genes in MS diet group, compared to control diet-fed group. **(e)** Quantification of expression levels of 5 genes of interest: *chitinase like 3*, *S100A8* (Calprotectin subunit), *Fut4*, *B3gat1* and *Lyz2* genes. Mann–Whitney test. \*p < 0.05.



**Figure 3.** MS diet decreases SIgA secretion and *E. coli* load in mice stools. (a) ELISA quantification of SIgA in fecal pellet of mice fed a control or MS diet ( $n=6$ ). (b) SIgA-coated bacteria were quantified in the stools of mice using flow cytometry. Anti-SIgA-PE antibody was used to detect IgA + bacteria. The data represent the percentage of IgA + bacteria in control diet (CTR) and MS diet groups, over the total number of events detected ( $n=10$  for each group). (c) qPCR relative quantification of *E. coli* in stools, standardized to the total copy number of 16S in mice fed CTR ( $n=16$ ) and MS diet ( $n=16$ ). (d) Quantification of Gram negative bacilli count on Drigalsky agar plate in stools from mice fed CTR ( $n=16$ ) and MS diet ( $n=16$ ). (e) Immunofluorescence staining of *E. coli* associated to colonic mucosa. *E. coli* bacteria were stained in green, DNA was stained in blue. White arrows indicate *E. coli* bacteria. Mann-Whitney test. *ns* non-significant. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

number of ileum-associated AIEC LF82 between the groups (Fig. 4c). These data agree with the due attention that *CEACAM6* gene is not expressed in ileal mucosa in this model (Fig. 1c). Nonetheless, a 11.51-fold decrease was noted in the number of bacteria associated to colonic mucosa of mice from the group fed MS diet compared to mice fed a control diet ( $p < 0.001$ ) (Fig. 4d). These data show that the micro-environment established by MS diet is not favorable for AIEC bacteria attachment and long-term colonization.

To better characterize the inflammatory response induced during the course of infection, we quantified the micro-inflammatory marker lipocalin-2 (Lcn-2) in the stools, during infection. We observed a significant increase in Lcn-2 levels, throughout the infection study, in mice fed control diet (from day 1 to day 3 post-infection). In contrast, no changes in Lcn-2 levels were measured in MS diet-fed mice during the course of infection (Fig. 4e). Lcn-2 level was 23.85 times lower in MS diet-fed mice compared to control diet-fed mice at day 3 post infection ( $p = 0.0159$ ). The analysis of pro-inflammatory cytokines release from colonic tissues showed a significant decrease in Keratinocyte Chemoattractant protein (KC) ( $p = 0.048$ ) and in IL-6 secretion ( $p = 0.008$ ) in mice fed an MS diet compared to mice fed a control diet (Fig. 4f–g). These data support the protective role of MS diet in the context of AIEC infection.



**Figure 4.** MS diet protects mice from AIEC intestinal colonization and inflammation. (a) Experimental protocol of infection used in the study. (b–d) AIEC LF82 load in (b) the stools at days 1, 2 and 3 post-infection, (c) associated to ileum and (d) associated to colonic mucosa was quantified on selective medium (CTR group: n = 11, MS diet: n = 13–15, two independent experiments pooled). (e) Micro-inflammation marker Lcn-2 was quantified in the stools, at days 1, 2 and 3 post-infection by ELISA (CTR group: n = 5, MS diet: n = 5). (f–g) Pro-inflammatory cytokines KC (Keratinocyte Chemoattractant) (f) and IL-6 (g) were quantified in colonic mucosa release medium by ELISA (n = 5 for each group). Mann–Whitney test. \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001.



	Overall population
	n = 28
Age at inclusion (years), mean $\pm$ SD	38.07 $\pm$ 13.1
Female gender, n (%)	19 (67.9%)
Active smokers, n (%)	7 (25.0%)
<b>Montreal classification</b>	
<i>CD location</i>	
L1, n (%)	10 (35.7%)
L2, n (%)	3 (10.7%)
L3, n (%)	14 (50.0%)
<i>CD behaviour</i>	
B1, n (%)	21 (75.0%)
B2, n (%)	4 (14.3%)
B3, n (%)	2 (7.1%)
<b>Current medications</b>	
5-ASA	2 (7.1%)
Corticoids	1 (3.6%)
Thipurines	4 (14.3%)
Methotrexate	1 (3.6%)
Infliximab	2 (7.1%)
Adalimumab	4 (14.3%)
Vedolizumab	0 (0.0%)
CDAI, mean $\pm$ SD	105.0 $\pm$ 80.95
CDEIS, mean $\pm$ SD	2.3 $\pm$ 2.9
Calprotectin, mean ( $\mu$ g/g) $\pm$ SD	154.81 $\pm$ 286.16
Chitinase 3-Like 1, mean (ng/g) $\pm$ SD	40.96 $\pm$ 56.95

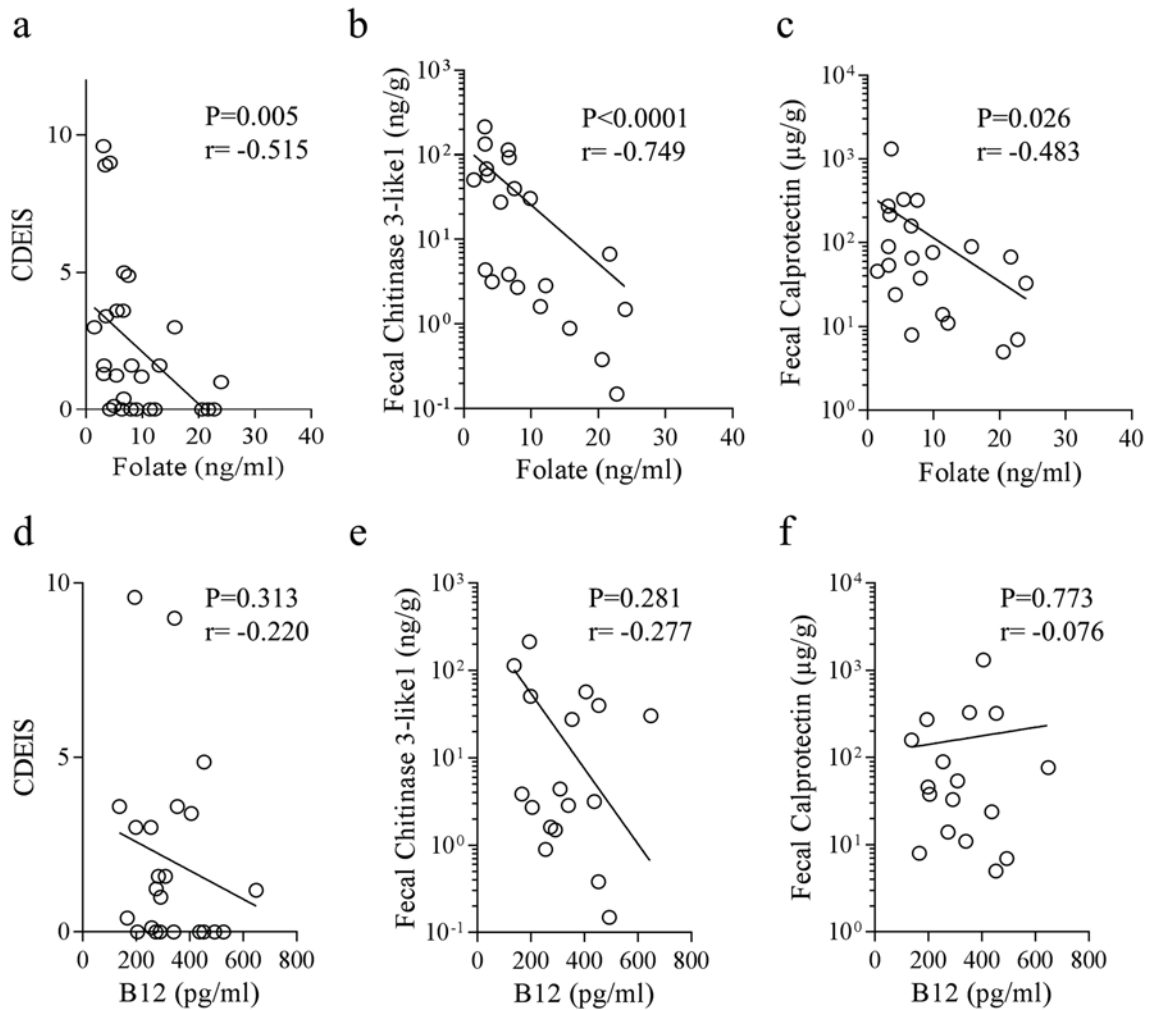
**Table 1.** Baseline characteristics of the 28 patients with CD enrolled in the study. *SD* standard deviation, *n* number, *CD* Crohn's disease, *CDAI* Crohn Disease Activity Index, *CDEIS* Crohn's disease endoscopic index of severity, 5-ASA acide 5-aminosalicylique.

**Serum B9 vitamin/Folate concentration is inversely correlated to intestinal inflammation in CD patients.** CD patients frequently present deficiencies in B9 (folate) and B12 vitamins. However, the interconnection between serum folate levels and intestinal inflammation in CD patients remains unclear. To answer this question, we used a previously established CD patients' cohort in the laboratory to quantify folate (B9 vitamin) and B12 vitamin in the serum (Table 1). The levels of folate ranged from 1.49 to 23.99 ng/ml, with a median of 9.01 ng/ml. Six patients out of 28 presented low folate levels (under 4.00 ng/ml), representing 21.43% of patients from our cohort. We determined whether correlation between folate levels and disease parameters exist. No correlation between folate levels and CDAI, disease location nor active smoking was identified in our cohort. Interestingly though, a significant inverse correlation between Crohn's disease endoscopic index of severity (CDEIS) and folate ( $n=28$  pairs, Spearman  $r=-0.515$ ,  $p=0.0048$ ) was uncovered (Fig. 5a). This finding suggests that a link could exist between folate level and endoscopic score in CD. To better characterize the relationship between folate and inflammation, Chitinase 3-Like 1 (Chi3-L1) and Calprotectin, two fecal inflammatory markers, were also quantified in the feces from the same patients<sup>39</sup>. It appeared that folate levels were clearly inversely correlated to Chitinase 3-Like 1 concentration in CD patients' feces ( $n=21$  pairs, Spearman  $r=-0.749$ ;  $p<0.0001$ ) (Fig. 5b). Folate levels were also inversely correlated to fecal Calprotectin concentration in CD patient's feces ( $n=21$  pairs, Spearman  $r=-0.483$ ;  $p=0.026$ ) (Fig. 5c). The patients presenting high levels of folate show the lowest levels of inflammatory markers in feces. In contrast, no significant inverse correlation was found between B12 vitamin concentrations and the inflammatory parameters we analyzed (Fig. 5d–f). These data imply that folate, a major methyl-donor molecule, could be predictive of endoscopic lesions and could play a role in the control of intestinal inflammation in CD patients.

## Discussion

Patients with Crohn's disease frequently present vitamin deficiencies such as vitamin B9 (Folate) and vitamin B12, as reported in many studies around the world<sup>15–19</sup> and recently confirmed in a review of meta-analyses by Piovani et al.<sup>40</sup>. Folate deficiencies in patients were associated with greater disease activity in a Spanish cohort<sup>19</sup>. Moreover, metabolomic study of serum samples from pediatric CD patients revealed amino acid metabolism, folate biosynthesis and signaling pathways as profoundly altered<sup>41</sup>.

Folate and other methyl-donor molecules play a crucial role in the maintenance of epigenetic marks such as DNA methylation. The importance of the epigenetic component in the etiology of CD has recently been illustrated by the demonstration of modified DNA methylation profiles in patients compared to healthy subjects<sup>5,7,9,12,42</sup>. Furthermore, polymorphisms in the *DNMT3a* gene (involved in the establishment of de novo DNA methylation



**Figure 5.** Serum folate level, but not B12 level, is inversely correlated to Crohn's disease endoscopic index of severity (CDEIS) and to fecal markers of inflammation. B9 (folate) and B12 vitamins were quantified in the sera of CD patients ( $n=28$  patients). (a, d) Correlation between CDEIS and serum vitamins level at time of endoscopy in CD patients. (b, e) Correlation between fecal Chitinase 3-Like 1 level and serum vitamins concentration in CD patients ( $n=21$  pairs). (c, f) Correlation between fecal Calprotectin level and serum vitamins concentration in CD patients ( $n=21$  pairs). Spearman test was used to assess the correlation existing between the two variables tested.

marks) were previously associated to an increased risk to develop CD, suggesting an important role of DNA methylation in the inflammatory process<sup>43</sup>. As previously reported, the *CEACAM6* gene that promotes the adhesion of AIEC bacteria to the intestinal epithelium, is a key gene in CD regulated in a methylation-dependent manner<sup>27,31</sup>. These data from the literature led the study moving on the hypothesis that a diet supplemented in methyl-donor molecules (MS diet) could be used to favor methylation of the *CEACAM6* promoter gene (among others). If so, this could lead to the decrease of *CEACAM6* expression in IECs, thereby limiting susceptibility of CD patients to be colonized by pathobiont bacteria, such as AIEC. To determine whether enrichment in methyl-donor molecules in the diet could modulate the expression of the *CEACAM6* gene, mice either received a control diet or an MS diet during the pregnancy. The analysis was carried out on the offspring, as previously reported in many studies interested in the effect of the diet on the establishment of DNA methylation marks<sup>32,35,44,45</sup>. The contribution of methyl-donor molecules group is attested here by the downregulation of *CEACAM6* gene expression in intestinal epithelial cells in vitro and in vivo. Note that in our transgenic mouse model, the human *CEACAMs* genes are under the control of their own human promoter, allowing the study of their regulation in vivo<sup>30</sup>. The supplementation of methyl-donor molecules by the diet is sufficient to methylate the *CEACAM6* gene promoter and to limit its expression. This was confirmed and demonstrated in vivo by an increase in the methylation of the HIF-1 transcription factor binding site, known to participate in gene transcription activation<sup>31</sup>. It is interesting to note that the expression of the other *CEACAMs* genes on the transgene, and in the genome, did not show any modification of their expression in response to the MS diet, suggesting methylation-independent regulation mechanisms for these genes. However, RNA-seq analysis has highlighted many genes regulated by the MS diet. The KEGG pathway analysis revealed several significantly modified biological pathways in response to the MS diet. As an example, genes involved in the "Mannose-O-type glycan biosynthesis" pathway *B3gat1* and

*Fut4* were down-regulated in the MS diet group. Glycosylation mechanisms are indeed important in the context of adhesion of AIEC bacteria to the intestinal epithelium as the bacterial FimH adhesin recognizes mannose residues attached on CEACAM6 protein, thus allowing the adhesion of the bacterium. AIEC also bind to the intestinal epithelium through the interaction between bacterial ChiA and intestinal N-glycosylated Chitinase 3-Like 1 protein<sup>28,46,47</sup>. Hence, decreasing glycosylation at the surface of the intestinal epithelium may be relevant to limit colonization by AIEC bacteria. The study of glycosylation of proteins in response to the MS diet deserves attention in future studies. The RNA-seq analysis also revealed an increase in the synthesis of Lysozyme 1 and 2, which are antimicrobial peptides<sup>48</sup>, as well as a decrease in the expression of the two inflammatory markers Chi3-L1 and Calprotectin (*SI100a8*)<sup>39</sup>. Moreover, we observed an increase in *Hspa1a* and *Hspa1b* gene expression, two members of HSP70 family. Ohkawara et al.<sup>49,50</sup> have shown that mice expressing high levels of HSP70 and HSP40, could resist to DSS-induced colitis. In contrast, inhibition of HSPs led to the opposite phenotype and resulted in the development of colitis. These observations suggest that methyl-donor molecules instigate a potential anti-bacterial transcriptomic program in colonic mucosa.

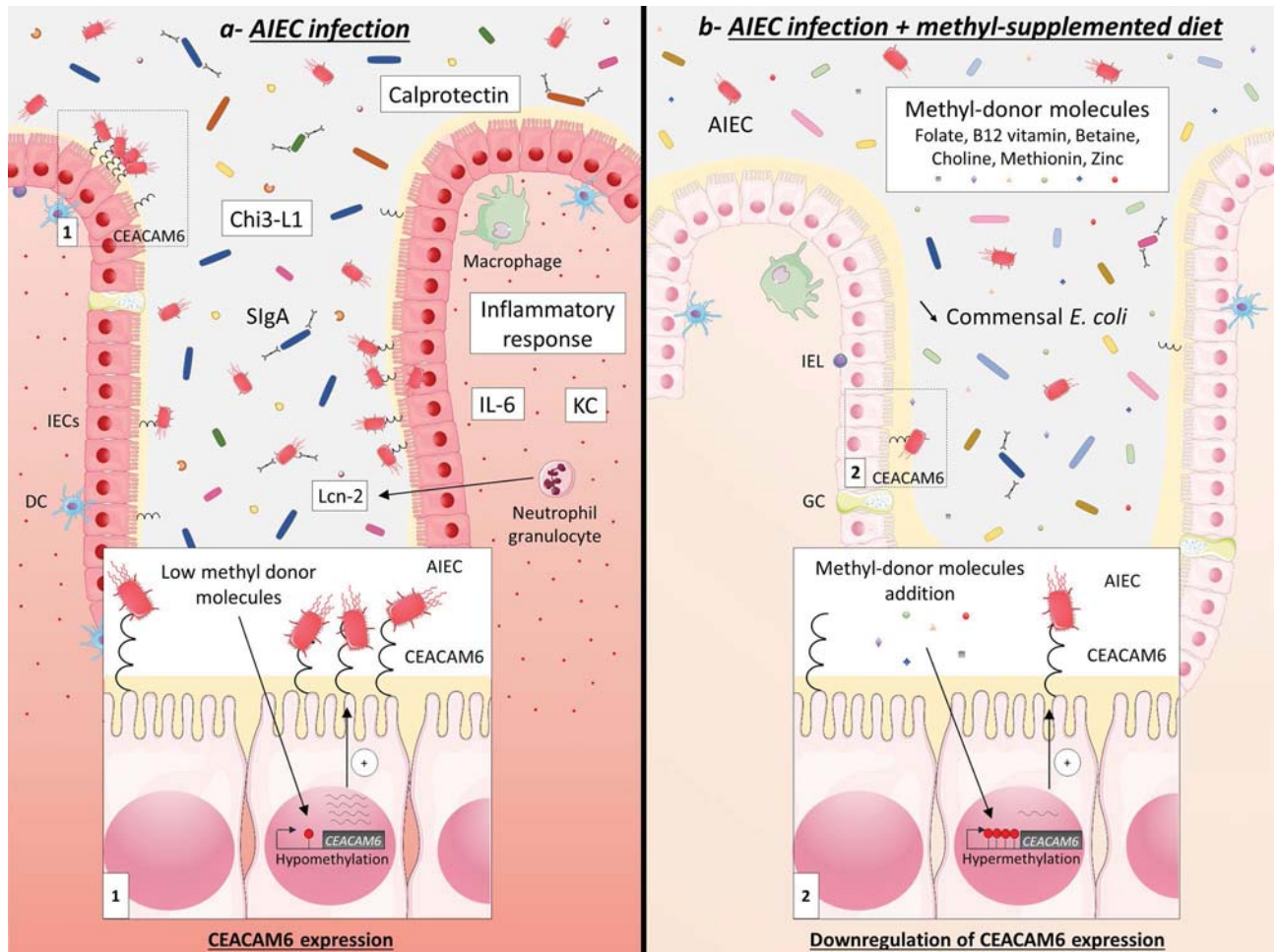
We have demonstrated here that the specific intestinal context induced by MS diet limited intestinal colonization by AIEC bacteria and controlled the inflammation induced during the course of the infection. One explanation could be that MS diet induces many changes in gene expression in intestinal mucosa, rendering the host more prone to counteract specific infectious agents. We observed an increase in the expression of genes involved in the synthesis pathway of SIgA. SIgA are dimeric immunoglobulins secreted in the mucus and known to limit the accession of bacteria to the intestinal epithelium<sup>51,52</sup>. It has been observed in murine models that SIgA preferentially target bacteria with colitogenic potential<sup>53</sup>. Despite the increased expression of these genes, fewer bacteria were coated with these antibodies in MS diet group, suggesting a less colitogenic microbiota in MS diet group compared to control group. Viladomiu et al.<sup>54</sup> observed a selective enrichment in IgA-coated Adherent-Invasive *E. coli* in patients with CD-associated spondylarthritis compared to CD alone without spondylarthritis. This observation suggests that AIEC bacteria can be targeted by SIgA in an inflammatory context and that stimulating this pathway could lead to a decrease AIEC load in CD patients. The levels of soluble IgA and the percentage of IgA-coated bacteria strikingly increases in feces of IBD patients and correlates with the disease activity<sup>55-57</sup>. This could be related to an over-activation of IgA-producing mucosal B-cells in response to bacterial stimulus of the adaptive immune system. In our study, the MS diet limited the proportion of bacteria coated with IgA, which was associated with a sharp decrease in *E. coli* population. It is likely that the micro-environment induced by the diet is unfavorable to the development of *E. coli* bacteria or favorable to their elimination and that such an environment could benefit to CD patients highly colonized by AIEC bacteria.

Finally, all the experiments presented here did not identify the methyl-donor molecule involved in the protective phenotype observed as this was not the main objective of this study. It is not clear whether the pool of methyl-donor molecules used is necessary to reach a protection against AIEC colonization or whether only one molecule is sufficient. This will be tested in a future study. Based on the literature, one of the most promising molecules is the zinc. Zinc deficiency is frequently observed in IBD patients with a prevalence ranging from 15 to 40%<sup>58-60</sup>. Pre-clinical studies highlighted that decreased zinc concentration in the serum is associated to increased inflammation through alteration of epithelial barrier function and increased pro-inflammatory cytokines IL1- $\beta$  and IL-6 in response to LPS stimulation, through promoter demethylation (for review<sup>60</sup> and<sup>61</sup>). However, it is likely that other molecules from the MS diet (betaine, folate, B12 vitamin, biotin, and methionine) all play a role in the regulation of genes expression and protection against AIEC through different but complementary mechanisms. Interestingly, in our study, we revealed for the first time, a statistically significant inverse correlation between serum folate and CDEIS. Besides, serum folate levels were inversely correlated with the concentration of inflammatory markers in the feces (Chitinase 3-Like 1 and Calprotectin). These data point out that the level of serum folate could be used, with the markers already described, as a biomarker of the disease activity.

To conclude, we have demonstrated that methyl-donor molecules enrichment in the diet modulates the expression of genes within intestinal mucosa, with induction of anti-microbial and anti-inflammatory genes and decrease in *CEACAM6* and genes involved in glycosylation pathway. MS diet feeding limits intestinal colonization by pathobiont, such as AIEC bacteria, by setting up an intestinal micro-environment unfavorable to their implantation (Fig. 6). Moreover, we demonstrated an inverse correlation between the endoscopic activity of the disease and the amount of serum folate in patients. These data suggest that it seems important to normalize folate level in CD patients colonized by pathobiont AIEC bacteria. However, further investigations are necessary to identify the better combination of molecules and the doses of methyl-donor molecules to treat Enterobacteria-colonized CD patients and to address possible long-term effects of methyl-donor molecules enrichment.

## Methods

**Crohn's disease patients.** Overall, 28 CD patients were prospectively and consecutively enrolled between September 2015 and September 2016. Clinical parameters including disease location and Crohn's disease endoscopic index of severity (CDEIS) are detailed in Table 1. Blood samples were taken prior to the endoscopy and sera were used to measure folate (B9 vitamin) concentration with an Advia Centaur folate kit (Chemiluminescence and competition test) using XPT-Centaur analyzer (Siemens, Tarrytown, USA). Samples presenting a maximal rate of 40 ng/ml of folate were included in the study. The samples above this value were considered as outliers and were removed from the study, based on the data from the literature<sup>17,19</sup>. Stools were collected in the morning the day before the endoscopy to reduce intra-individual variations, and were used to measure Calprotectin and Chi3-L1 by chemiluminescence DiaSorin LIAISON Calprotectin assay and Human Chitinase 3-Like 1 ELISA kit (R&D systems; Minneapolis, MN, USA) respectively, according to the manufacturer's instructions.



**Figure 6.** Methyl-donor supplementation in the diet prevents intestinal colonization by AIEC pathobiont. (a) In CEABAC10 mice fed a conventional diet, *CEACAM6* promoter is hypomethylated in IECs, which leads to a high expression of *CEACAM6* (insert 1) and, as a consequence, to a great ability of AIEC bacteria to colonize the intestinal mucosa and to induce a pro-inflammatory response (IL-6, KC, Chi3-L1, Calprotectin and Lcn-2). Numerous bacteria are also coated by SlgA in this specific context. (b) In CEABAC10 mice fed a methyl-donor-supplemented diet, *CEACAM6* gene promoter is hypermethylated in IECs, which leads to a decrease in its expression level (insert 2) and, as a consequence, to a lower intestinal colonization of the mucosa by AIEC bacteria and to a controlled inflammatory response. Of note, the load of commensal Enterobacteria is profoundly affected by the diet, which is associated to a lower IgA secretion in the lumen. *Chi3-L1* Chitinase 3-Like 1, *DC* dendritic cells, *GC* goblet cells, *IECs* intestinal epithelial cells, *IEL* intraepithelial lymphocytes, *IL-6* interleukin 6, *KC* keratinocyte chemoattractant, *Lcn-2* Lipocalin-2, *SlgA* Secretory Immunoglobulin A. This figure was created using Servier Medical Art templates, which are licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License; <https://smart.servier.com>.

**Mice generation, diets and infection.** All mice were housed in the animal care facility at the University Clermont Auvergne (Clermont-Ferrand, France). FVB/N WT mice were purchased from Charles River Laboratories and CEABAC10 transgenic mice (heterozygote<sup>30</sup>) were maintained in our animal facilities. WT and CEABAC10 mice were mated to obtain 50% WT mice and 50% CEABAC10 mice. Littermates were used for experimentation.

Two weeks before pregnancy, WT females were fed either standard food (Control diet), or a Methyl-Supplemented diet (MS diet) with enrichment in B12 vitamin, folate, methionine, betaine, zinc sulfate and choline (U8978 version 22, Special Diet Service, Saint Gratien, France) (Supplementary Table S4). The females were bred with transgenic CEABAC10 males. The pups were fed the same diet as their mother until sacrifice (6–8 weeks of age). Four weeks after birth, the offspring were sexed and genotyped.

For infection, mice were pretreated by oral administration of the broad-spectrum antibiotic streptomycin (10 mg intragastric per mouse) to disrupt normal resident bacterial flora in the intestinal tract and were orally challenged 24 h later with  $5.10^9$  AIEC LF82 bacteria cultured overnight in LB medium. AIEC LF82 in stools were counted at days 1, 2 and 3 post-infection by homogenization in PBS and numeration on agar plate containing Ampicillin (50 µg/ml) and Erythromycin (20 µg/ml). Three days after infection, mice were sacrificed and ileums and colons were extracted and washed in PBS. One cm was homogenized in 1 ml of physiologic water and serial



dilutions were plated on agar plates to count mucosa-associated bacteria and 1 cm was placed in DMEM medium with antibiotics (Gentamicin 50 µg/ml and antibiotic cocktail, PAA) for cytokine release measurement.

**RNA-extraction and RT-qPCR.** Total RNA from CEABAC10 colonic mucosa was extracted using Trizol reagent following the manufacturer's instructions. Briefly, 1 cm of colonic mucosa was homogenized in liquid nitrogen using mortar and pestle. The resulting powder was suspended in 1 ml Trizol reagent (Life Technologies) and 200 µL of chloroform were added. The tubes were vortexed and spin at 12,000 g for 10 min at 4 °C. The aqueous phase was transferred into a new tube and 500 µL of isopropanol were added for 30 min at RT for RNA precipitation. The tubes were spun at 12,000 g for 10 min at 4 °C and the pellet containing RNA was washed twice with 70% ethanol. The pellet was suspended in 50 µL RNase-free water. The RNA quality was assessed by bioanalyzer and their concentration was determined by fluorimeter Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) for RT-qPCR or mRNA-sequencing. mRNA were reverse transcribed using PrimeScript RT Reagent kit (Takara) following the manufacturer's instructions. After cDNA dilution (1/10), 1 µL of cDNA was used as a template for qPCR quantification (iTaQ Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad) and  $2^{-\Delta Ct}$  was applied to determine *CEACAM6* relative expression compared to the housekeeping gene *GAPDH*. Specific primer sequences used are listed in Supplementary Table S5 and each primer pair was designed on two different exons to span a large intronic region.

**mRNA-sequencing and bioinformatic analysis.** Libraries were generated from 500 ng of total RNA (RIN 7.40–9.40) as input according to TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation, after Poly(A) mRNA purification. Sequencing was performed using NextSeq500, 75 bp Single-read sequencing. Sequenced reads were aligned against the reference genome GRCm38, release 84, using bowtie software (<https://bowtie-bio.sourceforge.net>) and TopHat (<https://ccb.jhu.edu/software/tophat>). The 4 human *CEACAMs* genes (*CEACAM3*, *CEACAM5*, *CEACAM6* and *CEACAM7*) were added to the reference genome to assess the expression of human *CEACAMs* in the colon. The quality of the sequences was evaluated using Sequencing Analysis Viewer 1.8.37 (Illumina). 85% of reads were over the quality threshold (between 42,734,837 and 77,593,935 good quality reads were obtained). Uniquely mapped RNA-seq data were analyzed with SeqMonk version 1.44.0. Read counts were quantified over exons of merged transcripts using the SeqMonk RNA-seq quantitation pipeline. Differentially expressed genes were identified based on the raw read count quantitation over merged transcript isoforms with the multiple testing corrected DeSeq2 algorithms in SeqMonk. KEGG pathway analysis of misregulated genes was performed using WebGestalt (WEB-based GENE Set ANALYSIS Toll kit; Zhang, B) online software (<https://www.webgestalt.org/>).

**Western blot.** One cm of colonic mucosa was homogenized in liquid nitrogen using mortar and pestle. The powder was suspended in cell lysis buffer [60 mM Tris HCl pH 6.8; SDS 10% v/v, protease inhibitor (miniComplete, Roche)]. The suspension was sonicated (3 cycles of 15 s). Proteins concentration was determined using DC Protein Assay (Bio-Rad). All the samples were adjusted to an equivalent concentration in lysis buffer and the same volume as the sample of denaturation buffer was added [60 mM Tris-HCl pH 6.8, SDS 10% v/v, DTT 0.6% (w/v), Glycerol 20% and bromophenol blue]. The proteins were boiled 10 min at 95 °C before loading 6 µg in a 12% SDS-PAGE gel for electrophoresis migration and transfer to a nitrocellulose membrane (Amersham). After 1 h incubation in blocking buffer (PBS-Tween 20 0.05%, 5% BSA), membranes were blotted with the primary antibodies anti-CEACAM6 (1/2,000) (9A6 clone, Genovac) and anti-GAPDH (1/5,000, Cell Signaling) overnight at 4 °C. Membranes were washed with PBS-T and then incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. Proteins were detected using ECL (Thermo).

***E. coli* immunofluorescence.** This protocol was adapted from<sup>62</sup>. Snap frozen colon were embedded into optimal cutting temperature (OCT) medium and stored at –80 °C. Eight micrometers of frozen colon were cut in a cryostat. Colonic sections were fixed in 1% PFA for 20 min, washed in PBS and permeabilization was performed using 0.5X Triton X-100 in PBS for 20 min. Unspecific sites were blocked using PBS with 5% FBS and 2% BSA for 1 h. Goat anti-*E. coli* antibody (Serotec) was diluted in blocking buffer (1/150) and incubated overnight at 4 °C. After 3 PBS washes, tissues were incubated for 90 min with a donkey anti-goat-A488-conjugated secondary antibody diluted in PBS-FBS 5% supplemented with Hoechst. Slides were mounted using Mountex-mounting medium (CellPath). Tissues were visualized using a confocal microscope Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Inc).

**Cytokine quantification.** For cytokine release, 1 cm of colonic mucosa was placed in 1 ml of DMEM medium containing 20 µg/ml gentamicin, 200 U penicillin, 50 mg streptomycin per liter, 0.25 mg amphotericin B per liter, for 24 h and was maintained in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. The tissues were weighted for standardization. The medium was centrifuged and the supernatant was used for cytokines quantification by ELISA. Lipocalin-2 was quantified in weighted stools as previously described<sup>63</sup>. ELISA experiments were performed using 50 µl of medium-containing released cytokines with kits from R&D systems (KC/CXCL1: DY453, IL-6: DY406, Lcn-2: DY1857) following manufacturer's instructions.

**By cultural method.** Gram negative bacteria were quantified in stools of mice using Drigalsky gelosis. Briefly, stools were weighted and homogenized in 1 ml of PBS for 10 min. The suspension was serially diluted in PBS and 25 µl of each dilution were plated onto Drigalsky gelosis. Colonies were numbered 24 h later and the data were expressed as CFU/g of stool.



**By molecular quantification.** Genomic DNA was extracted from mice stools using Nucleospin Soil kit (MACHEREY–NAGEL) following the manufacturer’s instructions. The 16S rDNA was targeted by qPCR for quantification of *E. coli* by TaqMan approach using Dream Taq Master Mix (Thermo Fischer Scientific). The data are expressed as the quantity of 16S *E. coli* relative to total 16S *Eubacteria*. Primers used and PCR mix are specified in Supplementary Table S5.

**Flow cytometry for SIgA-coated bacteria quantification.** SIgA were quantified in weighted feces supernatant using a commercially available kit. SIgA-coated bacteria were quantified in the stools of mice as previously described<sup>33</sup> with minor changes. Briefly, frozen fecal pellets were suspended in ice cold PBS at a concentration of 50 mg/ml and incubated 1 h on ice before incubation for 15 min in disruptor. Samples were spun for 15 min at a speed of 500 g (4 °C). The supernatant, containing bacteria, was collected in a fresh tube and spun for 5 min at a speed of 8,000 g to pellet bacteria. The pellet was suspended in 1 ml staining buffer (1% BSA diluted in PBS) and spun as previously. Pellets were suspended in 100 µL blocking buffer (composed of staining buffer containing 20% FBS), and were incubated on ice for 20 min. One hundred µL of PE-conjugated mouse anti-IgA (IgA Monoclonal Antibody (11-44-2), PE, eBioscience; diluted 1/12.5 in staining buffer) were added to each tube and staining was performed on ice for 30 min. Three washes were performed with staining buffer before analysis on a BD LSRII. Data were then analyzed with BD FACS Diva and FlowJo. The PE positive gate was placed according to isotype control staining.

**Intestinal epithelial cells enrichment.** *CEACAM6* specific CpG methylation level was measured on enriched-IECs from colonic mucosa. Colons were flushed and washed 3 times with ice-cold PBS. 0.5 cm colonic sections were incubated in PBS-EDTA 2 mM for 1 h at 4 °C with slow agitation. PBS-EDTA was removed and the colonic sections were washed 3 times with PBS before release of colonic crypts by 1 min hand shaking. The suspension was filtered throughout a 70 µm cell strainer and spun down at 300 g for 10 min. The pellets containing crypts were washed 1 time with PBS and were stored at –80 °C until DNA extraction.

**Global DNA methylation quantification.** Genomic DNA was extracted from intestinal epithelial cells using NucleoSpin Tissue (Macherey–Nagel) following manufacturer’s instructions. Methylation level of LINE-1 was quantified using Global DNA Methylation LINE-1 Kit (Active Motif) following manufacturer’s instructions.

**Bisulfite modification and SnapShot analysis.** DNA from IECs was extracted using Nucleospin Tissue extract kit (Macherey–Nagel) following the manufacturer’s instructions. One µg of DNA was subjected to bisulfite modification using CpGenome Fast DNA modification Kit (Millipore) in accordance with the manufacturer’s instructions and as previously described<sup>31</sup>. *CEACAM6* promoter region of interest was amplified using primers described in Supplementary Table S5 (*CEACAM6* promoter modified by bisulfite). Thirty cycles of PCR were performed to amplify the CpG5-containing region of *CEACAM6* promoter, as follows: 1 min 95 °C, 1 min 52 °C and 3 min 72 °C (primers used in Supplementary Table S5). Purification of PCR products was performed using AMPure XP (Beckmann-Coulter, USA). Purified PCR products were then analyzed using a primer extension method (SnapShot). Extension primers annealed to the amplified DNA template immediately adjacent to CpG5 (Supplementary Table S5). Single nucleotide primer extension was performed in a final volume of 10 µl with 6 µl of purified PCR products, 3 µl of SnapShot reaction mix (Applied Biosystems, Evry, France) and 0.17 µM of a specific primer related to CpG5. Thermocycling conditions were: 94 °C for 5 min followed by 35 cycles of 94 °C for 10 s, 54 °C for 5 s and 60 °C for 10 s. The extended primers labelled with different fluorescent dyes were run on an ABI 3,500 capillary electrophoresis instrument and analyzed with GeneMapper software (Applied Biosystems, Evry, France). Peak area ratios were calculated to measure the relative percentage of methylation. This protocol was adapted from<sup>31</sup>.

**Statistical analysis.** Values are expressed as the mean ± SEM of ‘n’ number of experiments or median. Statistical analysis were performed using GraphPad Prism 6 for Windows version 6.07 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) software package for PC. Single comparisons were performed by unpaired Mann–Whitney. One way ANOVA was used when specified. A value of  $p < 0.05$  was considered as statistically significant. Two-sided Spearman test was used for correlations analysis.

**Ethical considerations.** The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki, Good Clinical Practice and applicable regulatory requirements. The study was approved by IRB “Comité de Protection des Personnes (CPP) Sud-Est 6”–France [approval number AU 904]. All the patients involved in the study have signed a written informed consent. All research was performed in accordance with relevant guidelines. Animal protocols were approved by the Committee for Research and Ethical Issues of the C2E2A (“Comité d’éthique pour l’expérimentation animale Auvergne” N°002, APAFIS#6,448-2017092216023907v1). All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

### Data availability

The datasets generated during the current study are available in the SRA repository, Bio Project PRJNA641769.

Received: 30 March 2020; Accepted: 8 July 2020

Published online: 31 July 2020

## References

- Ng, S. C. *et al.* Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet* **390**, 2769–2778 (2018).
- Crohn, B. B., Ginzburg, L. & Oppenheimer, G. D. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *Mt. Sinai J. Med.* **67**, 263–268 (2000).
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F. & Peyrin-Biroulet, L. Crohn's disease. *The Lancet* **389**, 1741–1755 (2017).
- Nimmo, E. R. *et al.* Genome-wide methylation profiling in Crohn's disease identifies altered epigenetic regulation of key host defense mechanisms including the Th17 pathway. *Inflamm. Bowel Dis.* **18**, 889–899 (2012).
- Lin, Z. *et al.* Identification of disease-associated DNA methylation in intestinal tissues from patients with inflammatory bowel disease. *Clin. Genet.* **80**, 59–67 (2011).
- Lin, Z. *et al.* Identification of disease-associated DNA methylation in B cells from Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Dig. Dis. Sci.* **57**, 3145–3153 (2012).
- Sadler, T. *et al.* Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression defines molecular characteristics of Crohn's disease-associated fibrosis. *Clin. Epigenetics* **8**, 30 (2016).
- McDermott, E. *et al.* DNA methylation profiling in inflammatory bowel disease provides new insights into disease pathogenesis. *J. Crohns Colitis* **10**, 77–86 (2016).
- Li Yim, A. Y. F. *et al.* Peripheral blood methylation profiling of female Crohn's disease patients. *Clin. Epigenetics* **8**, 65 (2016).
- Li Yim, A. Y. F. *et al.* A distinct epigenetic profile distinguishes stenotic from non-inflamed fibroblasts in the ileal mucosa of Crohn's disease patients. *PLoS ONE* **13**, e0209656 (2018).
- Ventham, N. T. *et al.* Integrative epigenome-wide analysis demonstrates that DNA methylation may mediate genetic risk in inflammatory bowel disease. *Nat. Commun.* **7**, 13507 (2016).
- Somineni, H. K. *et al.* Blood-derived DNA methylation signatures of Crohn's disease and severity of intestinal inflammation. *Gastroenterology* **156**, 2254–2265.e3 (2019).
- Ventham, N. T., Kennedy, N. A., Nimmo, E. R. & Satsangi, J. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics. *Gastroenterology* **145**, 293–308 (2013).
- Anderson, O. S., Sant, K. E. & Dolinoy, D. C. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 853–859 (2012).
- Pan, Y. *et al.* Associations between folate and vitamin B12 levels and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Nutrients* **9**, 382 (2017).
- Madanchi, M. *et al.* The relevance of vitamin and iron deficiency in patients with inflammatory bowel diseases in patients of the swiss IBD cohort. *Inflamm. Bowel Dis.* **24**, 1768–1779 (2018).
- Huang, S., Ma, J., Zhu, M. & Ran, Z. Status of serum vitamin B12 and folate in patients with inflammatory bowel disease in China. *Intest. Res.* **15**, 103–108 (2017).
- Bengi, G., Keyvan, H., Durmaz, S. B. & Akpınar, H. Frequency, types, and treatment of anemia in Turkish patients with inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **24**, 4186–4196 (2018).
- Bermejo, F. *et al.* Should we monitor vitamin B12 and folate levels in Crohn's disease patients?. *Scand. J. Gastroenterol.* **48**, 1272–1277 (2013).
- Yakut, M., Ustün, Y., Kabaçam, G. & Soykan, I. Serum vitamin B12 and folate status in patients with inflammatory bowel diseases. *Eur. J. Intern. Med.* **21**, 320–323 (2010).
- Darfeuille-Michaud, A. *et al.* Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **115**, 1405–1413 (1998).
- Darfeuille-Michaud, A. *et al.* High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* **127**, 412–421 (2004).
- Eaves-Pyles, T. *et al.* *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 (2008).
- Martin, H. M. *et al.* Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* **127**, 80–93 (2004).
- Martinez-Medina, M. *et al.* Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 872–882 (2009).
- Palmela, C. *et al.* Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut* **67**, 574–587 (2018).
- Carvalho, F. A. *et al.* Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J. Exp. Med.* **206**, 2179–2189 (2009).
- Barnich, N. *et al.* CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J. Clin. Investig.* **117**, 1566–1574 (2007).
- Chervy, M., Barnich, N. & Denizot, J. Adherent-invasive *E. coli*: update on the lifestyle of a troublemaker in Crohn's disease. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3734 (2020).
- Chan, C. H. F. & Stanners, C. P. Novel mouse model for carcinoembryonic antigen-based therapy. *Mol. Ther.* **9**, 775–785 (2004).
- Denizot, J. *et al.* Diet-induced hypoxia responsive element demethylation increases CEACAM6 expression, favouring Crohn's disease-associated *Escherichia coli* colonisation. *Gut* **64**, 428–437 (2015).
- Cooney, C. A., Dave, A. A. & Wolff, G. L. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J. Nutr.* **132**, 2393S–2400S (2002).
- Pauwels, S. *et al.* Dietary and supplemental maternal methyl-group donor intake and cord blood DNA methylation. *Epigenetics* **12**, 1–10 (2017).
- Miousse, I. R. *et al.* Short-term dietary methionine supplementation affects one-carbon metabolism and DNA methylation in the mouse gut and leads to altered microbiome profiles, barrier function, gene expression and histomorphology. *Genes Nutr.* **12**, 22 (2017).
- Mir, S. A. *et al.* Prenatal methyl-donor supplementation augments colitis in young adult mice. *PLoS ONE* **8**, e73162 (2013).
- Chen, M. *et al.* Methyl deficient diet aggravates experimental colitis in rats. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 2486–2497 (2011).
- Bressenot, A. *et al.* Methyl donor deficiency affects small-intestinal differentiation and barrier function in rats. *Br. J. Nutr.* **109**, 667–677 (2013).
- Bossenmeyer-Pourrié, C. *et al.* Methyl donor deficiency affects fetal programming of gastric ghrelin cell organization and function in the rat. *Am. J. Pathol.* **176**, 270–277 (2010).
- Buisson, A. *et al.* Faecal chitinase 3-like 1 is a reliable marker as accurate as faecal calprotectin in detecting endoscopic activity in adult patients with inflammatory bowel diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **43**, 1069–1079 (2016).
- Piovani, D. *et al.* Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: an umbrella review of meta-analyses. *Gastroenterology* **157**, 647–659.e4 (2019).
- Kolho, K.-L., Pessia, A., Jaakkola, T., de Vos, W. M. & Velagapudi, V. Faecal and serum metabolomics in paediatric inflammatory bowel disease. *J. Crohns Colitis* **11**, 321–334 (2017).
- Howell, K. J. *et al.* DNA methylation and transcription patterns in intestinal epithelial cells from pediatric patients with inflammatory bowel diseases differentiate disease subtypes and associate with outcome. *Gastroenterology* **154**, 585–598 (2018).

43. Franke, A. *et al.* Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat. Genet.* **42**, 1118–1125 (2010).
44. Nagy-Szakal, D. *et al.* Maternal micronutrients can modify colonic mucosal microbiota maturation in murine offspring. *Gut Microbes* **3**, 426–433 (2012).
45. Giudicelli, F., Brabant, A.-L., Grit, I., Parnet, P. & Amarger, V. Excess of methyl donor in the perinatal period reduces postnatal leptin secretion in rat and interacts with the effect of protein content in diet. *PLoS ONE* **8**, e68268 (2013).
46. Dreux, N. *et al.* Point mutations in FimH adhesin of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* enhance intestinal inflammatory response. *PLoS Pathog.* **9**, e1003141 (2013).
47. Low, D. *et al.* Chitin-binding domains of *Escherichia coli* ChiA mediate interactions with intestinal epithelial cells in mice with colitis. *Gastroenterology* **145**, 602–612.e9 (2013).
48. Ragland, S. A. & Criss, A. K. From bacterial killing to immune modulation: recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathog.* **13**, e1006512 (2017).
49. Hoter, A. & Naim, H. Y. The functions and therapeutic potential of heat shock proteins in inflammatory bowel disease—an update. *IJMS* **20**, 5331 (2019).
50. Ohkawara, T. *et al.* Resistance to experimental colitis depends on cytoprotective heat shock proteins in macrophage migration inhibitory factor null mice. *Immunol. Lett.* **107**, 148–154 (2006).
51. Bunker, J. J. & Bendelac, A. IgA responses to microbiota. *Immunity* **49**, 211–224 (2018).
52. Moor, K. *et al.* High-avidity IgA protects the intestine by enchainning growing bacteria. *Nature* **544**, 498–502 (2017).
53. Palm, N. W. *et al.* Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell* **158**, 1000–1010 (2014).
54. Viladomiu, M. *et al.* IgA-coated *E. coli* enriched in Crohn's disease spondyloarthritis promote TH17-dependent inflammation. *Sci. Transl. Med.* **9**, eaaf9655 (2017).
55. Lin, R. *et al.* Clinical significance of soluble immunoglobulins A and G and their coated bacteria in feces of patients with inflammatory bowel disease. *J. Transl. Med.* **16**, 359 (2018).
56. van der Waaij, L. A. *et al.* Immunoglobulin coating of faecal bacteria in inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 669–674 (2004).
57. Harmsen, H. J. M., Pouwels, S. D., Funke, A., Bos, N. A. & Dijkstra, G. Crohn's disease patients have more IgG-binding fecal bacteria than controls. *Clin. Vaccine Immunol.* **19**, 515–521 (2012).
58. Vagianos, K., Bector, S., McConnell, J. & Bernstein, C. N. Nutrition assessment of patients with inflammatory bowel disease. *JPEN J. Parenter. Enter. Nutr.* **31**, 311–319 (2007).
59. Alkhouri, R. H., Hashmi, H., Baker, R. D., Gelfond, D. & Baker, S. S. Vitamin and mineral status in patients with inflammatory bowel disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **56**, 89–92 (2013).
60. Gilcă-Blanariu, G.-E., Diaconescu, S., Ciocoiu, M. & Ștefănescu, G. New insights into the role of trace elements in IBD. *Biomed. Res. Int.* **2018**, 1–9 (2018).
61. Wong, C. P., Rinaldi, N. A. & Ho, E. Zinc deficiency enhanced inflammatory response by increasing immune cell activation and inducing IL6 promoter demethylation. *Mol. Nutr. Food Res.* **59**, 991–999 (2015).
62. Denizot, J. *et al.* Adherent-invasive *Escherichia coli* induce claudin-2 expression and barrier defect in CEABAC10 mice and Crohn's disease patients. *Inflamm. Bowel Dis.* **18**, 294–304 (2012).
63. Chassaing, B. *et al.* Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. *PLoS ONE* **7**, e44328 (2012).

## Acknowledgements

This study was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie, Inserm (UMR 1071), INRAE (USC-2018), Région Auvergne Rhône Alpes, FEDER (AAP Nouveau Chercheur—1640NCAA-AV0016772), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, “Contrat doctoral”, ECO201906008953) and by the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20–25), the National Program “Microbiote” Inserm, and Association François Aupetit (AFA). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. We would like to thank Fanny De Clercq who took part of this project, Sandrine Brugiroux, Romain Villéger and Gwenaëlle Roche for technical help and Abdelkrim Alloui from animal facility. We thank the company Helixio for great quality mRNA-sequencing. Finally, we thank Aurélie Mesclier-Fouré (from A To Language) for English editing.

## Author contributions

Experiments were initially conceived by J.D. and E.G., who also performed RNA-seq and western blots. E.G., A.S. and M.C. generated and genotyped mice, J.D. and E.G. performed microbiome analysis, bacterial infection, colonization follow up and cytokines measurements with the help from M.C. and A.A. RNA-seq analysis was performed by J.D. and E.G., SnapShot was performed by M.P. and S.V., flow cytometry by E.B., J.D. and M.C., patient's samples collection was performed by E.V. and A.B. and B9 vitamin, B12 vitamin, Chitinase and Calprotectin dosages were performed by R.M.Q. Manuscript was written by J.D., with contributions of most co-authors, funding were obtained by J.D. and N.B.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69472-3>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to J.D.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

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



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

© The Author(s) 2020

## Résumé

---

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI), très invalidante, évoluant par poussées d'intensités et de localisations variables entrecoupées de périodes de rémission clinique. Cette maladie est incurable, seuls des traitements symptomatiques sont disponibles à ce jour pour soulager les patients. Concernant l'étiologie de la MC, elle est multifactorielle, résultant de l'interaction complexe entre des prédispositions génétiques, des facteurs environnementaux et des altérations de la composition du microbiote. Le régime alimentaire de type occidental, enrichi en sucres, en graisses, en aliments transformés et pauvre en fibres, est un des principaux facteurs de l'environnement mis en cause dans le développement de la MC. De plus, des souches particulières d'*Escherichia coli*, les *E. coli* adhérents et invasifs (AIEC), colonisent anormalement la muqueuse iléale des patients atteints de MC *via* des mécanismes qui n'ont pas été totalement caractérisés. Depuis quelques années, un intérêt nouveau s'est porté sur l'implication des facteurs épigénétiques dans la pathogenèse de la MC. Des altérations des niveaux d'acétylation des histones ou encore une diminution de l'expression des histones désacétylases (HDACs) ont notamment été rapportées chez les patients atteints de MC. Ainsi, l'objectif principal de cette thèse était de mieux comprendre l'interaction AIEC-épithélium intestinal en se concentrant sur des facteurs épigénétiques et environnementaux.

Grâce à des études *in vitro* ainsi qu'à des validations *in vivo* et dans une large cohorte de patients atteints de MC, HDAC1 et HDAC5 ont été identifiées comme des acteurs centraux et antagonistes de la régulation de la colonisation intestinale par les Entérobactéries et les AIEC. Des analyses transcriptomiques réalisées sur des cellules transfectées avec des siARNs dirigés contre HDAC1 et HDAC5 ont révélé le rôle de HDAC1 dans le contrôle de la réponse inflammatoire et dans la formation du cytosquelette d'actine ainsi que celui de HDAC5 dans la perméabilité paracellulaire. Suite à la consommation d'un régime enrichi en graisses (HF), il a été observé une diminution de l'activité HDAC globale et une augmentation de l'expression de HDAC5, qui sont des conditions favorisant l'entrée des AIEC dans les cellules épithéliales intestinales. Aussi, suite à une nouvelle analyse transcriptomique, une répression des gènes impliqués dans la reconnaissance et la prise en charge des bactéries a été mise en évidence chez les souris nourries avec le régime enrichi, suggérant que le régime HF créerait un microenvironnement spécifique favorable à l'implantation des bactéries AIEC au niveau de la muqueuse iléale. Il a également été montré que les bactéries AIEC étaient capables, dans ce contexte, de moduler l'épigénome à leur avantage, afin de promouvoir leur propre colonisation. Ainsi, l'ensemble des données obtenues suggèrent que le ciblage de HDAC5, tout comme un rééquilibrage alimentaire, pourraient être des stratégies intéressantes pour limiter la colonisation intestinale par les bactéries AIEC chez les patients atteints de MC.

Au cours de ma thèse, j'ai également travaillé sur la mise au point d'un nouveau modèle murin pour l'étude de l'interaction AIEC-épithélium intestinal : le modèle Vill-*hCC6*, qui permet de reproduire l'expression iléale anormale du récepteur *CEACAM6*, sur lequel les AIEC se fixent majoritairement. Grâce notamment à l'observation que les bactéries AIEC persistaient préférentiellement dans l'intestin des animaux transgéniques, nous avons montré que le modèle Vill-*hCC6* pouvait constituer un bon modèle préclinique de MC iléale. À l'avenir, il pourra permettre de mieux comprendre le rôle des AIEC dans la MC mais également de développer et tester de nouvelles molécules et stratégies pour le ciblage spécifique des bactéries AIEC implantées dans la muqueuse iléale des patients.