



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle innovante du pathobionte pro-inflammatoire *Escherichia coli* adhérent et invasif (AIEC)

Maria Beatriz de Sousa Figueiredo

► **To cite this version:**

Maria Beatriz de Sousa Figueiredo. Caractérisation fonctionnelle innovante du pathobionte pro-inflammatoire *Escherichia coli* adhérent et invasif (AIEC). Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2023. Français. NNT : 2023ULILS045 . tel-04416614

HAL Id: tel-04416614

<https://theses.hal.science/tel-04416614>

Submitted on 25 Jan 2024

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

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

Université de Lille
École Doctorale Biologie Santé de Lille

Thèse de Doctorat d'Université
pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Lille

Spécialité :
Sciences de la Vie et de la Santé

**Caractérisation fonctionnelle innovante
du pathobionte pro-inflammatoire
Escherichia coli adhérent et invasif (AIEC)**

PRESENTEE ET SOUTENUE PAR MARIA BEATRIZ DE SOUSA FIGUEIREDO

Thèse dirigée par le Professeur Benoit FOLIGNÉ et le Docteur Marie TITÉCAT
Soutenue publiquement le 29 Septembre 2023 à Lille devant le jury composé de :

Docteur Éric GUÉDON	DR INRAE	Rapporteur
Professeur Imad KANSAU	PU Université Paris-Saclay	Rapporteur
Docteur Alain BAULARD	DR Inserm	Examineur
Docteur Catherine ECKERT	MCU-PH, APHP	Examineur
Docteur Quentin LAMY-BESNIER	Chercheur post doctoral, INRAE	Examineur
Docteur Delphine LEY	MCU-PH, Lille	Examineur



Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Institut de Recherche
Translationalnelle sur l'Inflammation (INFINITE) - U1286

dirigé par le Docteur Laurent DUBUQUOY,

Univ-Lille, Inserm, CHU Lille

sous la direction scientifique

du Professeur FOLIGNÉ et du Docteur Marie TITÉCAT

et pour partie,

au Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL) - UMR 9017

Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille

Ce travail a bénéficié du soutien d'un co-financement de la Région Hauts-de
France (50%) avec l'allocation de recherche ministérielle portée par l'école
doctorale ED 446 (50%).

Octobre 2020 - Septembre 2023

INFINITE : Faculté de Pharmacie – Bactériologie – 3 Rue du Professeur
Laguesse, 59000 Lille

INFINITE : Faculté de Médecine – Pôle Recherche – 5^e étage 1 Place de Verdun,
59045 Lille Cedex

CIIL : 1, rue du Professeur Calmette CNRS UMR9017 – Inserm U1019
Campus de l'Institut Pasteur de Lille 59019 LILLE Cedex.

REMERCIEMENTS

Dans un premier temps je souhaite remercier chaleureusement les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. L'évaluation d'une thèse est un travail long et consciencieux et je vous remercie d'avoir pris le temps de le faire. Merci aux rapporteurs, le **Professeur Imad KANSAU** et le **Professeur Éric GUÉDON** d'avoir pris le temps d'étudier mon manuscrit. Merci au **Docteur Alain BAULARD**, au **Docteur Catherine ECKERT**, au **Docteur Quentin LAMY-BESNIER** et au **Docteur Delphine LEY** d'avoir accepté d'être examinateurs.

Je souhaite remercier tout particulièrement mes directeurs de thèse, le **Professeur Benoit FOLIGNÉ** et le **Docteur Marie TITÉCAT** pour leur accompagnement tout au long de ma thèse. Vous m'avez apporté toute la rigueur scientifique et la passion de la recherche pour mener à bien cette thèse. Avec votre confiance, j'ai su entreprendre avec plaisir l'encadrement de stagiaires et du monitorat. Benoit, je te remercie pour m'avoir aidé à gérer mon stress au travers de séances de squash et d'avoir été à mon écoute quand cela était nécessaire. Marie, je tiens à te remercier pour ton investissement et plus particulièrement ta pugnacité qui a su m'inspirer depuis 4 ans.

Un grand merci aux membres du laboratoire de Bactériologie - Virologie, qui m'ont aidé de près ou de loin à mon épanouissement professionnel. Une pensée toute particulière pour **Docteur Christel NEUT**, pionnière dans l'étude des AIEC avec qui j'ai pu collaborer durant mes travaux. Merci à **Elisabeth** et à **Marie Françoise** pour leur bienveillance et leur enseignement dans mes premiers instants de monitorat. **Quentin**, je te remercie pour avoir su te rendre disponible et m'aider tant techniquement qu'intellectuellement sur cette dernière année de thèse. Je remercie tout particulièrement **Séverine**, **Isabelle** et **Fanny** pour avoir été un soutien aussi bien sur le plan technique que moral. Les instants café ou chocolat ont bien aidé à ça. Je saurai dorénavant la différence entre le cacao d'Amérique du Sud et d'Afrique. Je remercie également **Maxime** et **Benjamin** pour votre soutien, votre aide scientifique et pour nos conversations. Je tiens à remercier aussi les stagiaires qui m'ont aidé à fournir ce travail, ce fut un plaisir.

Je tiens à remercier aussi **Docteur Priscille BRODIN** pour m'avoir accueillie dans son équipe et permis de mener à bien ce travail de thèse. Un remerciement tout particulier au **Docteur Arnaud MACHELART**, **Alexandre VANDEPUTTE**, **Audrey TARRICONE** et **Nathalie**

DEBOOSERE pour votre accueil, votre patience et votre aide à chaque fois qu'il était nécessaire.

Je tiens aussi à remercier l'équipe du 5ème épicode Est et plus particulièrement les **Docteur Jean-Luc DESSEYN** et **Docteur Valérie GOUYER** pour leurs conseils scientifiques et leur accueil.

Aux membres d'INFINITE : **Léa, Lucie, Guillaume, Edwina, Nathan, Laure, Hélène, Eva, Sarra, Solange, Manel et Louisa**, merci pour votre joie de vivre communicative et pour ces moments de partage.

Merci à **Antonino BONGIOVANNI**, pour ta gentillesse, pour ta disponibilité et pour tes précieux conseils en microscopie. C'était un plaisir de pouvoir travailler avec toi.

Sur le plan personnel, je tiens à remercier **Elo, Alexiane** et **Emma** avec qui j'ai pu profiter pleinement de ma réussite au concours doctoral au Portugal. Depuis, vous avez toujours été un soutien ou une écoute pour savoir ce qu'il en était de mes bactéries. Merci pour tous ces échanges et ces soirées dansantes (Queres um biscoito ?).

Un remerciement tout particulier à **Momo**, qui depuis la Nouvelle Zélande a su me montrer les avancées dans mon parcours universitaire. Ton écoute et ta motivation m'ont aidé dans la réalisation de cette thèse. **Antho**, je pense qu'il est nécessaire de te remercier encore une fois pour m'avoir aidé à analyser mes données et me rappeler mes anciens cours de statistiques.

Une grosse pensée pour les filles de Nantes, **Mel, Célia** et **Juju** qui sont là depuis le Master 1. Votre bienveillance et votre folie sont certainement les qualités qui vous décrivent le mieux. Apprendre la publication de son premier article face au Lac Blanc auprès de vous a été l'une de mes plus belles récompenses.

A tous mes colocos lillois (**Marine, Alex, Adèle, Sixtine, Mathilde, Aubin, Loïc, Lou, Cloé, Sonia**) qui ont dû supporter ma préparation au concours doctoral ainsi que mon quotidien de doctorante. Ma vie lilloise a été une période pleine de vie et de drôlerie grâce à vous.

Une pensée toute particulière au groupe de Corse (**Fanny, Sév, Laeti, Chachou, Jordan, Alex, Guillaume**) pour votre soutien, pour ces instants et pour les événements joyeux de ces dernières années.

Un grand merci à ma **belle-famille** pour leur soutien et leur légèreté. C'est toujours un plaisir de passer un moment avec vous.

Je pense également à remercier mes **parents**, pour leur soutien tout au long de ces études et qui m'ont transmis la valeur du travail.

Un grand merci à ma **sœur**, qui m'a toujours poussé à aller plus haut. C'est en partie grâce à toi que je vais soutenir ma thèse prochainement. Merci **Vincent**, pour ta curiosité et ton écoute dans les moments bons et moins bons. Encore merci pour votre aide si précieuse à la préparation du concours doctoral.

Enfin, un énorme merci à **Solène**. Tu as été mon pilier dans ce projet depuis 2 ans. Merci pour ton soutien indéfectible, pour ta légèreté, pour ton accommodation face à mon rythme. Tu as toujours su me rassurer dans les moments moins bons et partager ma joie dans les meilleurs moments. Pour ton investissement, pour ta patience, pour ton œil graphique et pour ta présence indéniable, merci ! C'est avec impatience que je poursuis de nouvelles aventures avec toi.

RÉSUMÉ

Le pathobionte *Escherichia coli* adhérent et invasif (AIEC) a été identifié avec une prévalence plus élevée chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Les AIEC sont définis par leur capacité à (i) envahir les cellules épithéliales intestinales, (ii) survivre dans les macrophages (iii) sans marqueur génétique spécifique. Leur identification repose principalement sur des méthodes cellulaires conventionnelles fastidieuses, limitées par une faible reproductibilité et le petit nombre de souches testées. De plus, leur pathogénicité a été principalement étudiée sur la souche de référence LF82, négligeant une approche plus globale de cette population bactérienne.

Dans ce travail de thèse, nous avons évalué une approche *in vitro* et *in vivo* pour caractériser les AIEC de manière la plus efficace possible. Dans un but de reproductibilité, de robustesse et d'automatisation, une caractérisation des AIEC par imagerie à haut contenu (HCS) a été étudiée. Nous avons eu également recours successivement au modèle du nématode *Caenorhabditis elegans* tant que modèle d'étude hôte pathogène pour discriminer un nombre substantiel de souches d'*E. coli*.

Le modèle *C. elegans* a mis en évidence une affectation de la survie des vers infectés par les souches invasives, par rapport à des souches contrôles, non invasives. Toutefois, aucune corrélation a été soulignée entre l'intensité de l'invasion sur cellules épithéliales et la longévité atténuée du ver.

La mise au point de la caractérisation des AIEC par imagerie à haut contenu s'est précédée d'une évaluation des critères phénotypiques sur 110 souches issues de deux collections d'*E. coli*, une collection clinique et la collection de référence *E. coli* (ECOR). Les scores d'invasion des souches ont été définis sur 2 lignées cellulaires épithéliales (I-407 et Caco-2/TC-7) selon la procédure conventionnelle. Conformément aux critères de l'AIEC, chaque isolat a également été testé pour sa capacité de survie au sein macrophages murins J774-A1 ainsi que l'absence de déterminant de virulence par PCR. La capacité bactérienne à produire du biofilm a également été étudiée. Ces données ont permis la mise au point du protocole HCS sur cellules I-407 et Caco-2/TC-7. A partir d'un script d'analyse éprouvé, les caractéristiques microscopiques d'invasion ont été déterminées automatiquement avec le logiciel Columbus™. Cette méthode a été évaluée par analyse statistique pour définir la performance du test, en comparaison avec le gold standard.

D'autres expériences seront menées afin de mieux comprendre les déterminants de la pathogénicité des AIEC ainsi que les approches thérapeutiques.

Mots clés : AIEC • Imagerie à haut contenu • *C. elegans* • Caractérisation • Pathobionte • Microbiote intestinal

ABSTRACT

Adherent and invasive *Escherichia coli* (AIEC) pathobionts have been identified with a higher prevalence in patients with chronic inflammatory bowel disease (IBD). AIEC are defined by their ability to (i) invade intestinal epithelial cells, (ii) survive in macrophages (iii) without any specific genetic marker. Their identification relies mainly on fastidious conventional cell-based methods, limited by low reproducibility and the small number of strains tested. In addition, their pathogenicity has mainly been studied on the reference strain LF82, neglecting a more global approach of this heterogenous bacterial population.

In this work, we evaluated an *in vitro* and *in vivo* approach to characterize AIECs in the most efficient way possible. For the purposes of reproducibility, robustness and automation, a characterization of AIECs using high-content imaging (HCS) was studied. We also successively used the nematode model *Caenorhabditis elegans* as a pathogenic host study model to discriminate a substantial number of *E. coli* strains.

The *C. elegans* model demonstrated a clear effect on the survival of worms infected with invasive strains, compared with non-invasive control strains. However, no correlation was found between the intensity of invasion on epithelial cells and attenuated worm longevity.

The development of AIEC characterization using high-content imaging was preceded by an evaluation of phenotypic criteria on 110 strains from two *E. coli* collections, a clinical collection and the *E. coli* reference collection (ECOR). Strain invasion scores were defined on 2 epithelial cell lines (I-407 and Caco-2/TC-7) using conventional procedures. In accordance with AIEC criteria, each isolate was also tested for its ability to survive in J774-A1 murine macrophages, and for the absence of virulence determinants by PCR. The bacterial capacity to produce biofilm was also studied. These data led to the development of the HCS protocol on I-407 and Caco-2/TC-7 cells. Using an automatic analysis script, microscopic invasion characteristics were determined automatically with ColumbusTM software. This method was statistically analyzed to define the performance of the test in comparison with the gold standard.

Further experiments will be carried out to better understand the determinants of AIEC pathogenicity and therapeutic approaches.

Keywords: AIEC • High Content Imaging • *C. elegans* • Characterisation • Pathobiont • Intestinal microbiota

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
RESUME	6
ABSTRACT	8
SOMMAIRE	10
LISTE DES ABREVIATIONS	13
LISTE DES FIGURES	14
LISTE DES TABLEAUX	16
1. INTRODUCTION	19
1.1. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	20
1.1.1. Généralités	20
1.1.2. Épidémiologie	20
1.1.3. Traitements	21
1.1.4. Étiologie	22
1.1.4.1. Facteurs génétiques	23
1.1.4.2. Facteurs immunologiques	26
1.1.4.3. Facteurs environnementaux	26
1.1.4.4. Facteurs microbiens	29
1.2. Les <i>Escherichia coli</i> adhérents et invasifs (AIEC)	31
1.2.1. Définition	31
1.2.2. Physiopathologie des AIEC	31
1.2.2.1. Invasion des cellules épithéliales intestinales	31
1.2.2.1.1. Accès aux cellules épithéliales intestinales	31
1.2.2.1.2. Adhésion et invasion des cellules épithéliales intestinales ...	33
1.2.2.1.3. Effets délétères de l'invasion des AIEC	34
1.2.2.2. Survie au sein des macrophages	35
1.2.2.2.1. Survie et réplication	35
1.2.2.2.2. Persistance, biofilm et tolérance aux antibiotiques	36
1.2.3. Caractérisation des AIEC	38
1.2.3.1. Tests d'invasion sur lignées cellulaires épithéliales intestinales	38
1.2.3.2. Tests de survie sur lignée macrophagique	40
1.2.3.3. Exclusion des gènes de virulence de pathovars connus	41

1.2.3.4.	Présence inconstante d'autres gènes de virulence	42
1.2.4.	Les modèles d'études sur les animaux	44
1.2.5.	Les modèles alternatifs de caractérisation des AIEC	47
1.2.5.1.	Approche <i>in vitro</i> : l'imagerie à haut contenu (HCS)	48
1.2.5.2.	Approche <i>in vivo</i> : le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i>	50
2.	PROBLÉMATIQUE ET STRATÉGIES D'ÉTUDE	52
3.	MATÉRIELS ET MÉTHODES	53
3.1.	Tests conventionnels d'identification des AIEC	54
3.1.1.	Bactéries et conditions de culture	54
3.1.2.	Lignées cellulaires et entretien	54
3.1.3.	Tests d'invasion sur lignées cellulaires épithéliales intestinales	55
3.1.4.	Test de survie sur lignée macrophagique murine	56
3.1.5.	Génotypage de la virulence par RT-PCR quantitative	57
3.2.	Tests de formation de biofilm	59
3.3.	Tests d'invasion par HCS	60
3.3.1.	Tests d'invasion sur lignées cellulaires épithéliales intestinales	60
3.3.2.	Acquisition des images	61
3.3.3.	Analyse des images et script analytique	61
3.4.	Caractérisation fonctionnelle des AIEC sur modèle <i>C. elegans</i>	62
3.4.1.	Bactéries et conditions de culture	62
3.4.2.	<i>C. elegans</i> , culture et courbes de survie	63
3.4.3.	Lignées cellulaires et tests d'invasion sur cellules épithéliales intestinales	64
3.4.4.	Microscopie	65
3.5.	Statistique	65
3.5.1.	Caractérisation phénotypiques et génotypiques des <i>E. coli</i>	65
3.5.2.	Caractérisation de l'invasivité des souches par HCS	65
3.5.3.	Caractérisation des AIEC à l'aide du nématode <i>C. elegans</i>	66
4.	RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	67
4.1.	Caractérisation phénotypique et génotypique des souches	68
4.1.1.	Invasivité des souches sur lignée cellulaire épithéliale I-407	68
4.1.2.	Invasivité des souches sur lignée cellulaire épithéliale Caco-2/TC-7	71
4.1.3.	Survie et réplication des souches sur lignée macrophagique J774-A1	75
4.1.4.	Caractérisation génotypique des souches	80

4.1.5. Identification des AIEC	80
4.2. Biofilm, invasion et survie des souches	90
4.2.1. Caractérisation de la capacité des souches à former du biofilm (48 heures)...	90
4.2.1.1. Biofilm et invasivité des souches	93
4.2.1.2. Biofilm et survie des souches	94
4.2.1.3. Corrélation entre le biofilm, l'invasion et la survie des souches ?	95
4.2.2. Caractérisation de la capacité des souches à former du biofilm (3 heures) ..	96
4.2.2.1. Biofilm et invasivité des souches	99
4.2.2.2. Biofilm et survie des souches	100
4.2.2.3. Corrélation entre le biofilm, l'invasion et la survie des souches ? ...	101
4.3. Tests d'infection en HCS	102
4.3.1. Mise au point du test d'infection sur lignée épithéliale I-407	102
4.3.1.1. Application du test conventionnel au test d'infection par HCS	102
4.3.1.2. Criblage et caractérisation des souches par HCS	103
4.3.1.3. Étude de la performance du test	109
4.3.2. Mise au point du test d'infection sur lignée épithéliale Caco-2/TC-7	111
4.3.2.1. Application du test conventionnel au test d'infection par HCS	111
4.3.2.2. Criblage et caractérisation des souches par HCS	111
4.3.2.3. Étude de la performance du test	115
4.4. Caractérisation fonctionnelle du pathobionte sur modèle <i>C. elegans</i>	116
4.4.1. Colonisation d' <i>E. coli</i> et survie de <i>C. elegans</i>	116
4.4.2. Profils invasifs <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	121
4.4.3. Évaluation de la pathogénicité de l'AIEC chez <i>C. elegans</i>	123
5. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	125
5.1. Caractérisations phénotypique et génotypique des <i>E. coli</i>	127
5.2. Caractérisation de l'invasivité des souches par HCS	128
5.3. Caractérisation des AIEC à l'aide du nématode <i>C. elegans</i>	130
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	134
ANNEXE	142

ABBREVIATIONS

A

AIEC : *Escherichia coli* adhérent invasif

ASF : Flore altérée de Schaedler

ATG16L1 : *Autophagy related 16 like 1*

B

BME : Basal Medium Eagle

C

C.elegans : *Caenorahbditis elegans*

CEA : Antigène Carcino Embryonnaire

CEACAM 6 : *Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 6*

Chi3L1 : *Chitinase 3 like 1*

CMV : Cytomégalovirus

CRP : Protéine C-réactive

D

DAEC : *Escherichia coli* diffuse adhérente

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DSS : Dextran Sulfate de Sodium

E

EAEC : *Escherichia coli* entéroaggrégatif

EBV : Virus Epstein Barr

E. coli : *Escherichia coli*

ECOR : Collection de référence *E. coli*

EHEC : *Escherichia coli*

entérohémorragique

EIEC : *Escherichia coli* entéroinvasif

EPEC : *Escherichia coli* entéro-pathogène

ETEC : *Escherichia coli* entérotoxinogène

H

HCS : Criblage à Haut Contenu

HBI : Indice de Harvey Bradshaw

I

I_REPL : Index de répllication

IBC : Communautés Bactériennes

Intracellulaires

IBF : Indice de Formation de Biofilm

IFN- γ : Interféron gamma

Il-1 β : Interleukine – 1 bêta

Il – 6 : Interleukine 6

Il – 8 : Interleukine 8

IRGM : *Immunity related GTPase M*

L

LPF : Longue Fimbriae Polaire

LTH1 : Lymphocyte T Helper de type 1

LTH17 : Lymphocyte T Helper de type 17

LTH 2 : Lymphocyte T Helper de type 2

M

MC : Maladie de Crohn

MDM : Macrophages Dérivés de Monocytes

MDP : Peptidoglycane Muramyl Dipeptide

MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin

MOI : Multiplicité d'Infection

N

NOD2 : *Nucleotide-binding oligomerization domain 2*

O

OR : Odd- ratio

P

PFA : Paraformaldéhyde

R

RCH : Rectocolite Hémorragique

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute Medium*

S

SI : Score d'Invasion

SVF : Sérum de Veau Foetal

T

TNF- α : Facteur de Nécrose Tumorale α

U

UFC : Unité Formant Colonie

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Evolution des MICI dans les pays occidentaux, les pays nouvellement industrialisés et les pays en développement.....	21
Figure 2. Pathogénèse et rôle de l’environnement, de la génétique, de l’immunité et du microbiote sur l’apparition et maintien des MICI.....	23
Figure 3. Susceptibilités génétiques et leurs fonctions associées dans la pathogénèse des MICI.....	24
Figure 4. Facteurs environnementaux, immunologiques et microbiens contribuant à la pathogénèse des MICI.....	27
Figure 5. Facteurs modulant le microbiote intestinal.....	30
Figure 6. Dysbiose associée aux MICI.....	30
Figure 7. Mécanismes d’adhésion, d’invasion et de survie des AIEC chez un patient Crohn...34	
Figure 8. Stratégies utilisées par AIEC LF82 pour survivre dans les macrophages.	37
Figure 9. Les différentes étapes du processus de l’imagerie à haut contenu appliquées au criblage de molécules pharmaceutique et à la détection de micro-organismes intra-cellulaires	50
Figure 10. Scores moyens d’invasion des souches <i>E. coli</i> issues de la collection ECOR aux cellules I-407.....	69
Figure 11. Scores moyens d’invasion des souches <i>E. coli</i> issues de la collection clinique aux cellules I-407.....	70
Figure 12. Scores moyens d’invasion des souches <i>E. coli</i> issues de la collection ECOR aux cellules Caco-2/TC-7.....	72
Figure 13. Scores moyens d’invasion des souches <i>E. coli</i> issues de la collection clinique aux cellules Caco-2/TC-7.....	73
Figure 14. Scores moyens d’invasion des souches <i>E. coli</i> issues de la collection ECOR et clinique (n=101) pour la lignée cellulaires I407 et Caco-2/TC-7.....	74
Figure 15. Évaluation du pourcentage de bactéries internalisées par les macrophages J774-A1 des souches <i>E. coli</i> issues de la collection ECOR.....	76
Figure 16. Évaluation du pourcentage de bactéries internalisées par les macrophages J774-A1 des souches <i>E. coli</i> issues de la collection clinique (n = 40 incluant la souche probiotique Nissle 1917 et la souche AIEC LF82).....	77
Figure 17. Évaluation du taux de survie à 24 h post-infection des bactéries internalisées 1 heure post-infection par les macrophages J774-A1 (collection ECOR).....	78
Figure 18. Évaluation du taux de survie à 24 h post-infection des bactéries internalisées 1 heure post-infection par les macrophages J774-A1 (collection clinique).....	79
Figure 19. Évaluation de l’indice moyen de formation de biofilm des souches <i>E. coli</i> issues de la collection ECOR	91

Figure 20. Évaluation de l'indice moyen de formation de biofilm des souches <i>E. coli</i> issues de la collection clinique.....	92
Figure 21. Évaluation de l'indice moyen de formation de biofilm des souches <i>E. coli</i> issues de la collection ECOR.....	97
Figure 22. Évaluation de l'indice moyen de formation de biofilm des souches <i>E. coli</i> issues de la collection clinique.....	98
Figure 23. Étapes du script analytique.....	103
Figure 24. Évaluation du pourcentage de cellules infectées (PCI) à 3 h post-infection (MOI 50) sur cellules épithéliales I-407 (collection clinique).....	105
Figure 25. Évaluation du pourcentage de cellules infectées (PCI) à 3 h post-infection (MOI 50) sur cellules épithéliales I-407 (collection ECOR).....	106
Figure 26. Évaluation du pourcentage de cellules infectées (PCI) à 3 h post-infection (MOI 10) sur cellules épithéliales I-407 (collection clinique).....	107
Figure 27. Évaluation du pourcentage de cellules infectées (PCI) à 3 h post-infection (MOI 10) sur cellules épithéliales I-407 (collection ECOR).....	108
Figure 28. Évaluation du pourcentage de cellules infectées (PCI) à 3 h post-infection (MOI 50) sur cellules épithéliales Caco-2/TC-7.....	113
Figure 29. Évaluation du pourcentage de cellules infectées (PCI) à 3 h post-infection (MOI 10) sur cellules épithéliales Caco-2/TC-7.....	114
Figure 30. Diagrammes de survie Kaplan-Meier des essais de destruction de <i>C. elegans</i> (N2) infecté par six souches différentes d' <i>E. coli</i>	117
Figure 31. Comparaisons par paire des effets des souches d' <i>E. coli</i> sur la durée de vie de <i>C. elegans</i>	118
Figure 32. Comparaisons par paires des effets de modulation de la durée de vie de <i>C. elegans</i> par les souches d' <i>E. coli</i>	119
Figure 33. Comparaisons par paires des effets de modulation de la durée de vie de <i>C. elegans</i> par les souches d' <i>E. coli</i>	120
Figure 34. Microscopie confocale illustrant les rares événements de souches d' <i>E. coli</i> adhérant aux cellules (extracellulaires) et envahies par les cellules (intracellulaires) sur les cellules I-407 après une incubation de 3 h et des lavages approfondis.....	121
Figure 35. Souches d' <i>E. coli</i> différentes dans leur capacité à envahir les cellules I-407.....	122
Figure 36. Courbes de survie de Kaplan – Meier à partir d'essais de destruction individuels pour <i>C. elegans</i> (PX627) infectés par 16 souches distinctes d' <i>E. coli</i>	123
Figure 37. Absence d'association entre la durée de vie médiane (LT 50) de <i>C. elegans</i> infecté par <i>E. coli</i> et le taux d'invasion correspondant avec la lignée cellulaire épithéliale I-407.....	124

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Récapitulatif des différentes conditions d'infection utilisées pour l'invasion des AIEC sur cellules épithéliales intestinales.....	39
Tableau 2. Récapitulatif des différentes conditions d'infection utilisées pour la survie et réplication des AIEC au sein macrophages.....	41
Tableau 3. Gènes de virulence caractéristiques des pathovars <i>E. coli</i>	42
Tableau 4. Gènes impliqués et fonctions associées dans l'invasion épithéliale intestinale et survie macrophagique sur le pathovar AIEC.....	44
Tableau 5. Amorces employées pour la détection des gènes de virulence.....	58
Tableau 6. Profils phénotypiques des 7 souches AIEC invasives sur 2 lignées cellulaires (I-407 et Caco-2/TC-7).....	81
Tableau 7. Profils phénotypiques des souches AIEC (n = 6 ; invasives sur la lignée cellulaires (I-407) (collection ECOR).....	82
Tableau 8. Profils phénotypiques des souches AIEC (n = 16 ; invasives sur la lignée Caco-2/TC-7) (collection ECOR et clinique).....	83
Tableau 9. Profils phénotypiques représentant l'invasivité des souches sur les 2 lignées cellulaires I-407 et Caco-2/TC-7 ainsi que la capacité de survivre au sein des macrophages J774-A1. Les gènes de virulence ont été étudiés à partir de la collection ECOR (ECOR 1 à ECOR 19) incluant la souche cytotoxique 6.....	84
Tableau 10. Profils phénotypiques représentant l'invasivité des souches sur les 2 lignées cellulaires I-407 et Caco-2/TC-7 ainsi que la capacité de survivre au sein des macrophages J774-A1. Les gènes de virulence ont été étudiés à partir de la collection ECOR (ECOR 20 à ECOR 38).....	85
Tableau 11. Profils phénotypiques représentant l'invasivité des souches sur les 2 lignées cellulaires I-407 et Caco-2/TC-7 ainsi que la capacité de survivre au sein des macrophages J774-A1. Les gènes de virulence ont été étudiés à partir de la collection ECOR (ECOR 39 à ECOR 58) incluant les souches cytotoxiques ECOR 52, ECOR 53 et ECOR 54.....	86
Tableau 12. Profils phénotypiques représentant l'invasivité des souches sur les 2 lignées cellulaires I-407 et Caco-2/TC-7 ainsi que la capacité de survivre au sein des macrophages J774-A1. Les gènes de virulence ont été étudiés à partir de la collection ECOR (ECOR 59 à ECOR 70) et clinique (EC-6023 à EC-6100) incluant les souches cytotoxiques ECOR 59, ECOR 60, ECOR 61 et EC-6023.....	87
Tableau 13. Profils phénotypiques représentant l'invasivité des souches sur les 2 lignées cellulaires I-407 et Caco-2/TC-7 ainsi que la capacité de survivre au sein des macrophages J774-A1. Les gènes de virulence ont été étudiés à partir de la collection clinique (EC-6122 à EC-7078) incluant les souches cytotoxiques EC-6200 et EC-7076.....	88

- Tableau 14.** Profils phénotypiques représentant l'invasivité des souches sur les 2 lignées cellulaires I-407 et Caco-2/TC-7 ainsi que la capacité de survivre au sein des macrophages J774-A1. Les gènes de virulence ont été étudiés à partir de la collection clinique (EC-7089 à EC-7137) incluant les souches cytotoxiques EC-7134, la souche probiotique Nissle 1917 et AIEC LF82.....89
- Tableau 15.** Évaluation de la corrélation entre l'invasion des souches et la production de biofilm des souches *E. coli* (collection ECOR et clinique (n = 101 pour la lignée I-407 ; n = 100 pour la lignée Caco-2/TC-7)). Aucune corrélation n'a été démontrée par le test Chi-2 (*p-value* = 0,86).....94
- Tableau 16.** Évaluation de la corrélation entre la survie, la réplication et la mort bactérienne des souches et la production de biofilm des souches *E. coli* (collection ECOR et clinique ; n = 109). Aucune corrélation n'a été démontrée par le test de Chi-2 (*p-value* = 0,36).....95
- Tableau 17.** Évaluation d'une existence de corrélation entre le biofilm (absence, présence, niveaux) et l'invasivité (lignées cellulaires I-407 et Caco-2/TC-7) ou la survie bactérienne (mort, survie, réplication bactérienne). Les valeurs représentées sont les *p-value* obtenues à partir du test de Chi-2.....96
- Tableau 18.** Evaluation de la corrélation entre l'invasion des souches et la production de biofilm des souches *E. coli* (collection ECOR et clinique (n=101 pour la lignée I-407 ; n = 100 pour la lignée Caco-2/TC-7)). Aucune corrélation n'a été observée par le test Chi-2 (invasivité sur I-407 et biofilm : *p-value* = 0,21 ; invasivité sur Caco-2/TC-7 et biofilm : *p-value* = 0,27)...100
- Tableau 19.** Évaluation de la corrélation entre la survie, la réplication et la mort bactérienne des souches et la production de biofilm (T3 heures) des souches *E. coli* (collection ECOR et clinique (n = 109)). Aucune corrélation n'a été démontrée par le test Chi-2 (*p-value* = 0,33).101
- Tableau 20.** Évaluation d'une existence de corrélation entre le biofilm (absence, présence, niveaux) et l'invasivité (lignées cellulaires I-407 et Caco-2/TC-7) ou la survie bactérienne (mort, survie, réplication bactérienne). Les valeurs représentées sont les *p-value* obtenues à partir du test de Chi-2.....102
- Tableau 21.** Proportion des souches positives et négatives attribuées selon le pourcentage de cellules infectées suivant deux multiplicités d'infection (MOI 10 ; MOI 50) sur la lignée épithéliale I-407.....104
- Tableau 22.** Corrélation entre les souches positives et négatives attribuées selon le pourcentage de cellules infectées (MOI 10 ; MOI 50) aux souches invasives et non invasives obtenues par tests conventionnels sur la lignée épithéliale I-407. Les valeurs indiquées représentent la proportion des souches suivant les conditions.....109
- Tableau 23.** Evaluation de la performance du test d'invasion par imagerie à haut contenu comparativement à la technique gold standard selon le pourcentage de cellules infectées (MOI 10 ; MOI 50) sur la lignée épithéliale I-407.....110

Tableau 24. Proportion des souches positives et négatives attribuées selon le pourcentage de cellules infectées suivant deux multiplicités d'infection (MOI 10 et MOI 50) sur la lignée épithéliale Caco-2/TC-7.....113

Tableau 25. Corrélation entre les souches invasives et non invasives attribuées selon le pourcentage de cellules infectées (MOI 10 et MOI 50) aux souches invasives et non invasives obtenues par tests conventionnels sur la lignée épithéliale Caco-2/TC-7. Les valeurs indiquées représentent la proportion des souches suivant les conditions.....113

Tableau 26. Evaluation de la performance du test d'invasion par imagerie à haut contenu comparativement à la technique gold standard selon le pourcentage de cellules infectées (MOI 10 ; MOI 50) sur la lignée épithéliale Caco-2/TC-7.....116

INTRODUCTION

1.1. LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN

1.1.1. Généralités

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), comprennent deux pathologies : la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Ce sont des troubles gastro-intestinaux inflammatoires chroniques, alternant des phases de poussées inflammatoires (phase symptomatique) et des phases de rémission (phase asymptomatique) de durées variables. Pour 15% des patients souffrants de MICI, le diagnostic clinique ne permet pas de définir clairement leur pathologie et les associe aux colites indéterminées. La RCH se caractérise par une inflammation du tube digestif centrée sur le rectum et le côlon. Pour la MC, elle se caractérise par une inflammation qui peut affecter l'ensemble du tractus gastro-intestinal, de la bouche à l'anus ([Verstockt et al., 2022](#)). Ces deux pathologies peuvent s'accompagner de manifestations extra-intestinales (articulaires, cutanées, oculaires) ([Kim et al., 2018](#)). Ici, nous nous intéresserons uniquement à la maladie de Crohn.

La majorité des patients atteints de la MC présente des symptômes cliniques non spécifiques à cette pathologie : douleurs abdominales, diarrhées persistantes (glaiseuses, sanglantes), cachexie. L'ulcération de la paroi digestive, la formation de fistules, d'abcès, de fissures anales, des sténoses et fibroses sont d'autres signes cliniques ([Neurath, 2014](#)).

1.1.2. Epidémiologie

Dans le monde, près de 7 millions de personnes sont atteintes des MICI en 2017 ([Alatab et al., 2020](#)). Historiquement, l'apparition des MICI suivait un gradient Nord-Sud, avec une incidence plus élevée en Amérique du Nord, en Océanie ou en Europe. Depuis une cinquantaine d'années, les MICI se développent également en Asie, Amérique du Sud et en Afrique, faisant des MICI un fardeau mondial ([Borowitz, 2023](#)). Quatre stades épidémiologiques des MICI ont été mis en évidence : une phase d'émergence, une phase d'accélération de l'incidence, une phase de prévalence aggravante et une phase d'équilibre de la prévalence ([Figure 1](#)).

Actuellement, les pays en développement présentent une faible incidence des MICI. Pour les pays nouvellement industrialisés, le taux d'incidence augmente, associé à une faible

prévalence. Pour les pays occidentaux, le taux d'incidence se stabilise ou diminue, associé à un taux de prévalence plus élevé (Kaplan & Windsor, 2021).

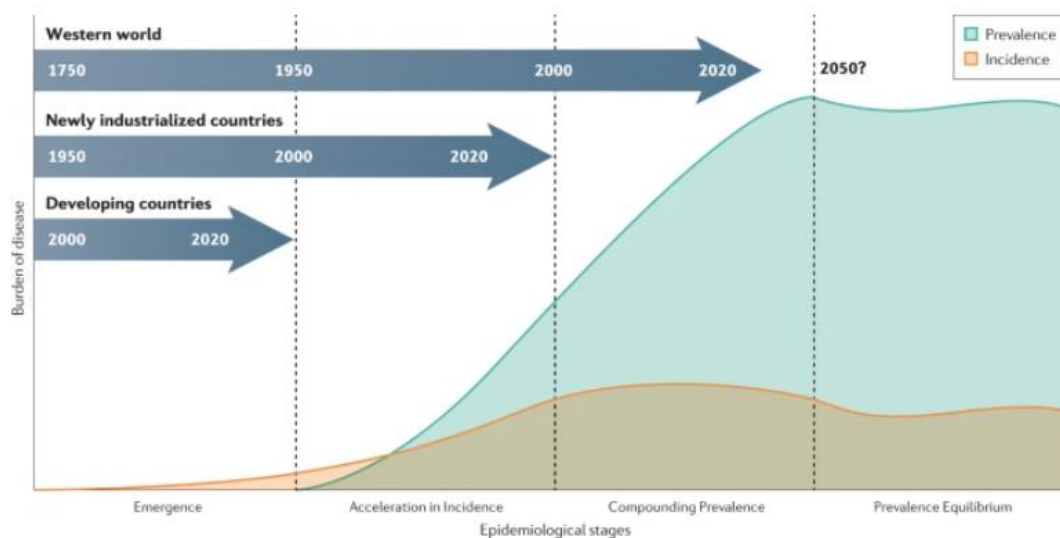


Figure 1. Evolution des MICI dans les pays occidentaux, les pays nouvellement industrialisés et les pays en développement (Kaplan & Windsor, 2021)

Les hypothèses actuelles face à la recrudescence des MICI sont liées à l'industrialisation et au mode de vie occidental. L'amélioration du diagnostic, du statut socio-économique ainsi qu'un meilleur accès aux soins a impacté l'évolution épidémiologique des MICI. Dans un contexte d'industrialisation, la modification du régime alimentaire et ses conséquences sur le microbiote constituent d'autres facteurs associés à l'apparition des MICI (Alatab *et al.*, 2020 ; Lovasz *et al.*, 2013).

Les MICI ne présentent pas de biais sexuel, touchant autant les femmes que les hommes, principalement chez les jeunes adultes (Kökten *et al.*, 2016). Toutefois, une recrudescence de la forme pédiatrique a été soulignée (Levine *et al.*, 2011)

1.1.3. Traitements

A ce jour, les traitements administrés aux patients de Crohn sont « palliatifs » et essentiellement symptomatiques, avec pour but une diminution des signes cliniques en phase active de la maladie et la prévention des poussées. Quatre axes de thérapie sont proposés, comprenant respectivement les aminosalicylés (5-ASA), les corticostéroïdes classiques et à action locale intestinale, les immunosuppresseurs (thiopurine et méthotrexate) et les biothérapies (anti-TNF, anti-intégrine, anti-interleukine). Des traitements non médicamenteux sont également étudiés. Parmi les traitements, l'aphérèse leucocytaire, la neurostimulation vagale et la transplantation du microbiote fécal sont en cours

d'investigation. A l'heure actuelle, ces traitements sont soit inefficaces ou nécessitent des études de plus grande envergure afin d'apprécier la réponse thérapeutique des différentes approches (d'après AFA Crohn).

1.1.4. Etiologie

L'étiologie des MICI reste complexe, associant des facteurs génétiques, immunologiques, environnementaux et microbiens. Elle se traduit par une réponse immunitaire anormale face au microbiote commensal (Wallace *et al.*, 2014). L'une des hypothèses serait que dans un contexte génétique et environnemental, la muqueuse intestinale des patients serait altérée. L'impact au niveau mucosal induit un déséquilibre de la flore commensale favorisant la colonisation de microorganismes pathogènes et une réaction inflammatoire exacerbée. Ce déséquilibre de la flore intestinale associée à une perte de diversité microbienne et une augmentation est caractéristique de la dysbiose. La boucle d'activation immunitaire chronique aboutit ainsi à des complications physiologiques et à une destruction tissulaire de la muqueuse intestinale du patient (Figure 2). Cette altération induit une pénétration des bactéries commensales et des bactéries pathogènes. Cette modification microbienne et tissulaire induit une activation du système immunitaire liée à une production accrue de cytokines. Un déséquilibre des voies pro-inflammatoires et anti-inflammatoires conduit à un état inflammatoire chronique chez le patient, aboutissant à des complications de la maladie de type fibrose, sténose, abcès, fistule, cancer colorectal, cachexie ou arthrite.

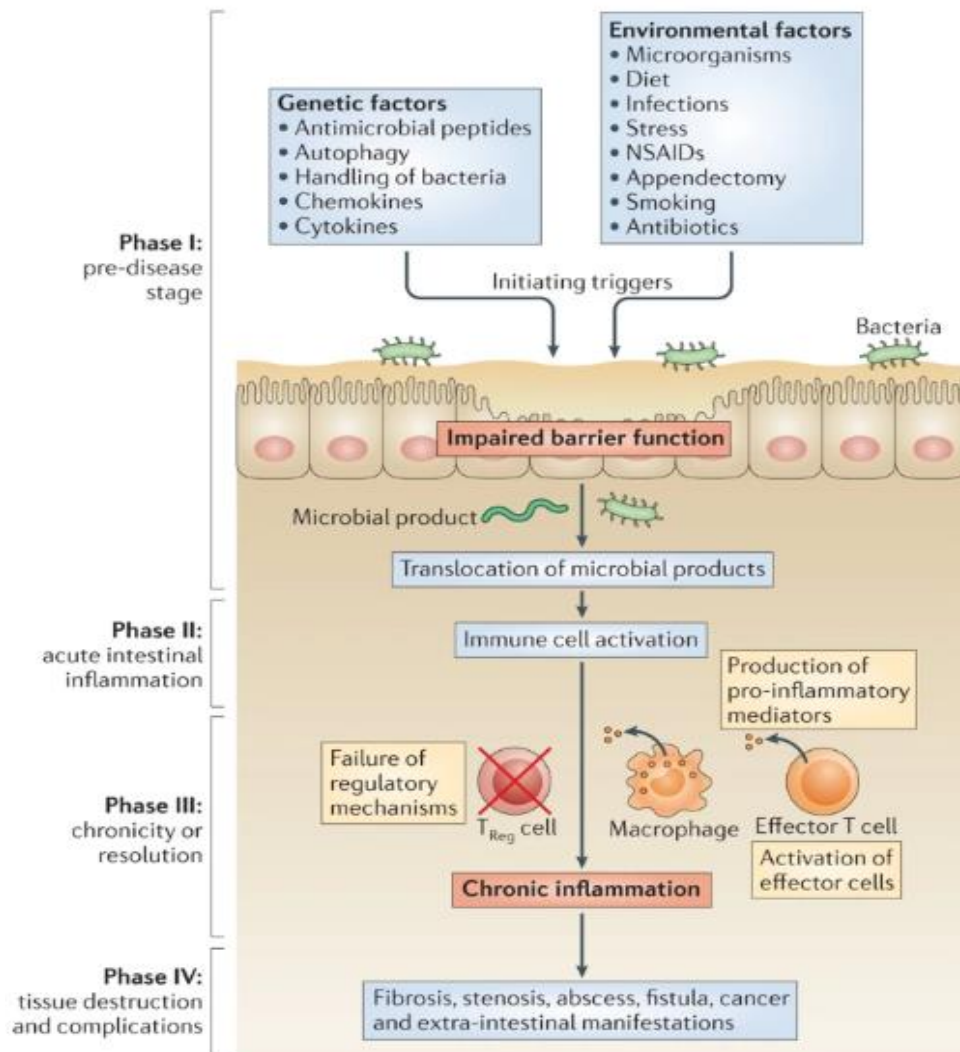


Figure 2. Pathogenèse et rôle de l'environnement, de la génétique, de l'immunité et du microbiote sur l'apparition et maintien des MICI (d'après Neurath, 2014).

La physiopathologie de la maladie de Crohn se subdivise en 4 phases : une phase de pré-maladie associée aux facteurs environnementaux, génétiques et microbiens ; une phase d'inflammation intestinale associée au système immunitaire ; une phase de rémission ou active associée à l'état inflammatoire du patient ; une dernière phase associée aux complications histopathologiques.

1.1.4.1. Facteurs génétiques

Sur le plan génétique, près de 200 variants génétiques ont été associés aux MICI, impliqués notamment dans la réponse immunitaire innée et adaptative, l'autophagie, le stress du réticulum endoplasmique, les fonctions de barrière de l'épithélium intestinal et les mécanismes de défense anti-bactérienne (Figure 3). Parmi les gènes identifiés, les mutations

de *NOD2* (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2*) ont été fortement associées à la maladie de Crohn (Hugot *et al.*, 2001).

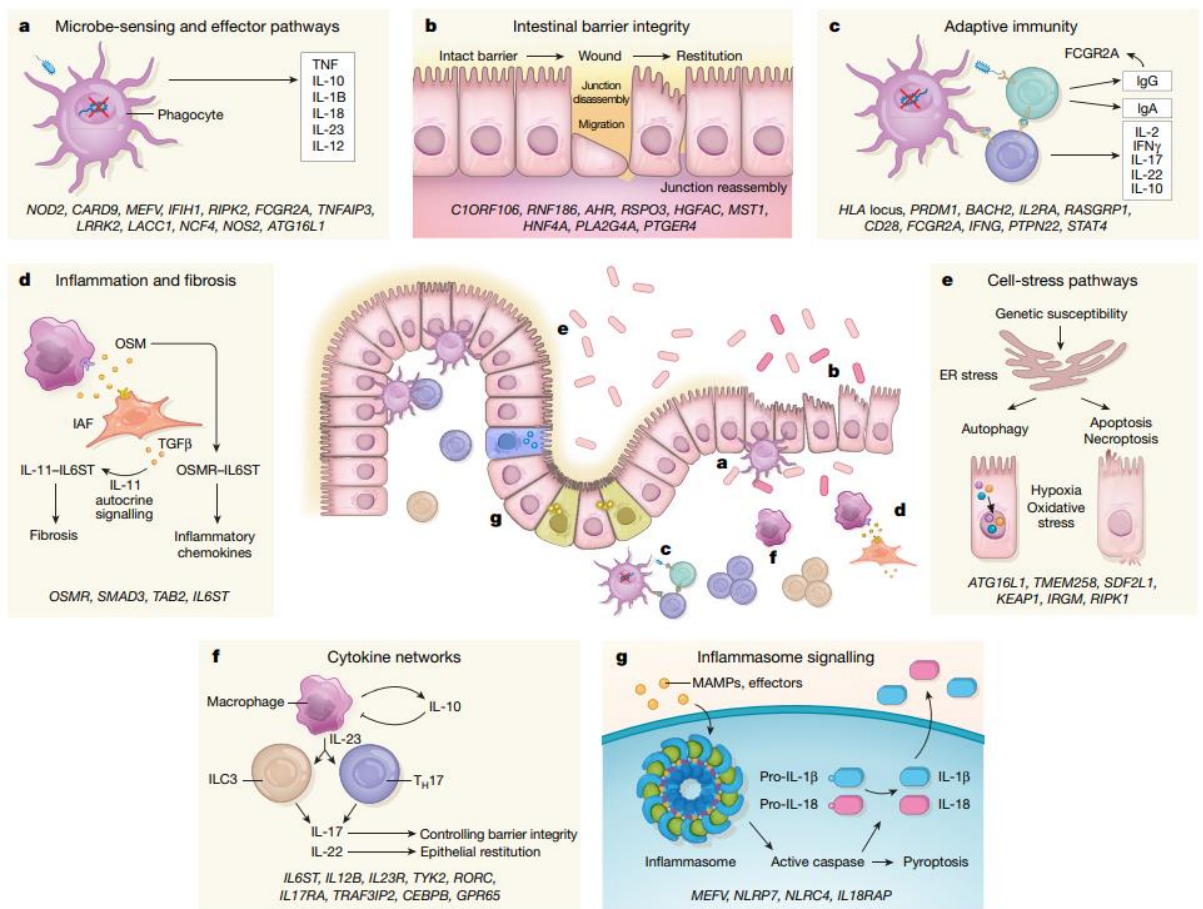


Figure 3. Susceptibilités génétiques et leurs fonctions associées dans la pathogenèse des MICI. Les variants génétiques présentés peuvent, (a) empêcher la phagocytose des agents bactériens ; (b) altérer l'intégrité de la barrière intestinale ; (c) altérer la réponse immunitaire adaptative ; (d) exacerber la réponse inflammatoire ; (e) impacter la réponse cellulaire face au stress du réticulum endoplasmique, le stress oxydatif, l'hypoxie, l'autophagie et les voies de mort cellulaire ; (f) moduler la réponse cytokinique ; (g) moduler la signalisation de l'inflammasome (d'après Graham & Xavier, 2020).

Le gène *NOD2* a été reconnu comme ayant un rôle prépondérant dans l'évolution de la maladie de Crohn (Nayar *et al.*, 2021; Verstockt *et al.*, 2018). *NOD2* s'exprime majoritairement dans les cellules de Paneth mais peut s'exprimer dans les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes T. La protéine *NOD2* intervient dans l'autophagie, la détection bactérienne, l'expression du peptide antibactérien α -défensine par les cellules de Paneth (Iida *et al.*, 2017). La protéine *NOD2* peut activer une voie pro-inflammatoire ou déclencher l'autophagie par association avec *ATG16L1* (*Autophagy related 16 like 1*) (Khor *et al.*, 2011). Dans la MC, le polymorphisme de *NOD2* ne permet plus la reconnaissance au

récepteur intracellulaire du peptidoglycane bactérien muramyl dipeptide (MDP). De fait, une signalisation pro-inflammatoire n'aboutit pas en réponse avec les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules de Paneth. L'altération de la fonction barrière associée à une invasion du microbiote commensale et pathogènes est une autre conséquence du polymorphisme *NOD2* retrouvé chez les patients atteints de la maladie de Crohn. Le défaut d'autophagie lié à *ATG16L1* et de sa stimulation, associée à une hausse de cytokines pro-inflammatoires due à la dysbiose, contribuent davantage à une réponse inflammatoire dérégulée (Ashton *et al.*, 2023).

Étroitement lié au gène *NOD2*, le gène *ATG16L1* est impliqué dans l'autophagie bactérienne. Le gène *ATG16L1* présente une mutation faux-sens conduisant à la substitution de thréonine à l'alanine en position 300. Contrairement à d'autres mutations, le polymorphisme d'*ATG16L1* n'affecte pas la fonction de la protéine mais en diminue la quantité au niveau cellulaire (Murthy *et al.*, 2014 ; Verstockt *et al.*, 2018). En réponse à un état dysbiotique (perturbation de la structure du microbiote intestinal), le recrutement de la protéine *ATG16L1* par la protéine *NOD2* initie l'autophagie et contribue à la sécrétion des peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth. Dans la MC, le recrutement direct d'*ATG16L1* par la protéine *NOD2* au site d'entrée bactérienne est défectueux, ne permettant pas la formation d'autophagosomes. Le polymorphisme d'*ATG16L1* induit également une baisse de peptides antimicrobiens pouvant être associée au dimorphisme des cellules de Paneth des patients présentant ce variant (Cadwell *et al.*, 2008). L'implication de ces 2 gènes et les dérégulations associées contribueraient au développement de la pathologie (Travassos *et al.*, 2010 ; Verstockt *et al.*, 2018).

L'étude GWAS de 2007 a identifié le gène *IRGM* comme un gène de susceptibilité associé à la MC, avec une association préférentielle à la MC iléale (Parkes *et al.*, 2007). La protéine *IRGM* (*Immunity Related GTPase M*) s'exprime dans le gros intestin, l'intestin grêle et les lymphocytes. La protéine *IRGM* est impliquée dans l'autophagie bactérienne, plus précisément dans le trafic et l'acidification vacuolaire, la maturation des phagosomes et l'autophagie induite par le virus. Cette hypothèse a été étayée par la découverte d'un polymorphisme de délétion de 20 kb en amont du gène *IRGM* (Cadwell *et al.*, 2008).

1.1.4.2. Facteurs immunologiques

Chez les patients de Crohn, une activation incontrôlée du système immunitaire contribue à l'inflammation intestinale chronique. Une perte de la fonction de barrière induit le recrutement des macrophages, des cellules T et des cellules lymphoïdes innées. L'activation de ces cellules immunitaires aboutit à une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 1 bêta (IL-1 β), l'interleukine 6 (IL-6), l'interleukine 8 (IL-8), l'interféron gamma (IFN γ) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) en grande quantité (Saez *et al.*, 2023).

Parallèlement, les cellules du système immunitaire intestinal des patients de Crohn diffèrent des individus sains. Une augmentation de macrophages pro-inflammatoires CD14+ associée à une diminution des recrutements de neutrophiles favorisent une réponse immunitaire chronique (Saez *et al.*, 2023).

La différenciation des LT CD4+ en lymphocytes T effecteurs (lymphocyte T helper de type 1 - LTH1 ; lymphocyte T helper de type 2 - LTH2 ; lymphocyte T helper de type 17 - LTH17) est associée à une hausse de sécrétion de cytokines pro inflammatoires (Mowat, 2003).

1.1.4.3. Facteurs environnementaux

L'impact de l'environnement sur l'apparition des MICI chez les individus est désormais avéré (Figure 4). Malgré la prédisposition génétique, des études épidémiologiques ont démontré une forte corrélation avec les facteurs environnementaux. Une augmentation des cas de MICI concernant les populations migrantes vers des pays industrialisés a été mise en évidence (Burisch *et al.*, 2014 ; Cosnes *et al.*, 2011). De plus, l'évolution des MICI à l'échelle mondiale contribue à entériner l'impact de l'environnement sur l'apparition des MICI ou sa modulation (Ananthakrishnan *et al.*, 2018).

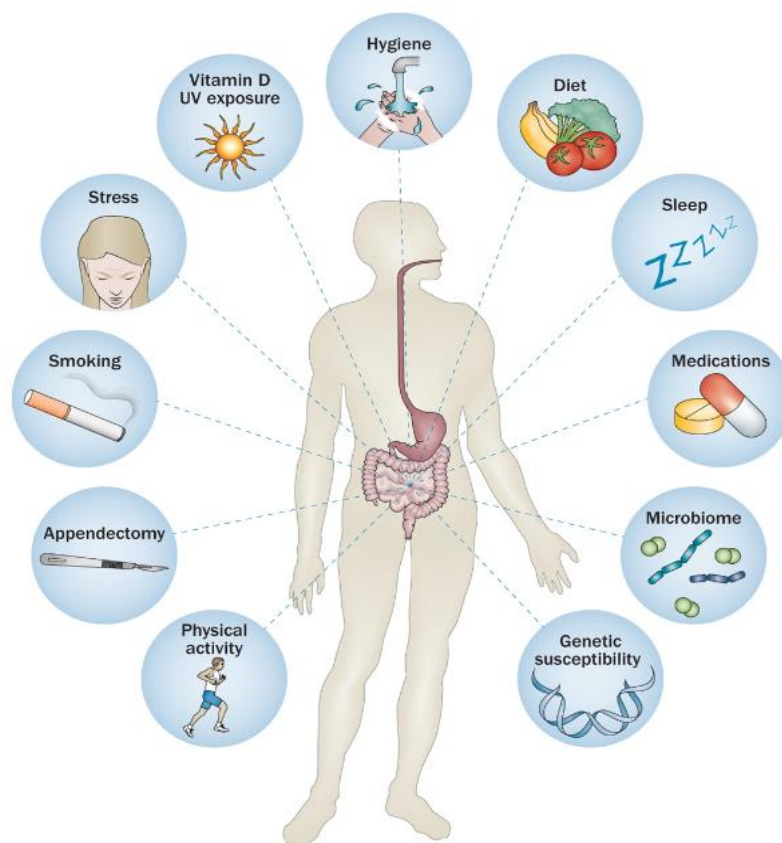


Figure 4. Facteurs environnementaux, immunologiques et microbiens contribuant à la pathogénèse des MCI (d'après Ananthkrishnan, 2015).

Les premières années de vie peuvent impacter l'apparition des MCI chez les patients au travers de l'allaitement (maternel, durée) et les facteurs périnataux. L'allaitement maternel diminuerait le risque de développer une MC (odd-ratio ; OR = 0,71) et une colite ulcéreuse (OR = 0,78). Une durée d'allaitement plus importante (12 mois *versus* 3 ou 6 mois) est associée à une moindre survenue des MCI (Xu *et al.*, 2017). Parmi les 17 facteurs périnataux étudiés, le tabagisme maternel durant la grossesse (OR = 2,04) et l'âge sont des facteurs favorisant les MCI chez l'enfant (OR = 4,81) (Roberts *et al.*, 2011).

Un mode de vie urbain accroît le risque de développer des MCI. L'impact est d'autant plus important si ce mode de vie est attribué à la période infantile et adolescente (Benchimol *et al.*, 2017).

La pollution atmosphérique pourrait être un facteur supplémentaire sur l'apparition des MCI et notamment en Asie dans un contexte d'industrialisation rapide (Abegunde *et al.*, 2016). Toutefois, des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer le mécanisme impliqué.

Pour la MC, plusieurs études suggèrent fortement l'effet nocif du tabagisme sur le tractus gastro-intestinal. Les particules ingérées par le fumeur peuvent affecter la composition luminale. Ces conséquences pourraient provenir d'une inhibition et d'une altération de la composition du mucus. A partir d'un modèle murin, une augmentation d'expression de la mucine 2 (Muc2), la mucine 3 (Muc3) au niveau de l'iléon et de la mucine 4 (Muc4) au niveau du côlon a été démontrée (Allais *et al.*, 2016 ; Berkowitz *et al.*, 2018). Une dysbiose a aussi été mentionnée, comprenant une diminution de l'abondance relative des *Firmicutes* et des *Actinobacteria* au détriment des *Bacteroidetes* et *Proteobacteria* (Biedermann *et al.*, 2013). Une autre étude révèle la baisse de diversité microbienne chez les fumeurs atteints de la MC (Opstelten *et al.*, 2016). Une augmentation de la perméabilité intestinale a été démontrée, également associée à une altération de la cicatrisation des ulcères (Berkowitz *et al.*, 2018).

Pour la RCH, le tabagisme a une faible incidence et peut présenter un effet protecteur. Toutefois, l'arrêt du tabagisme peut augmenter l'activité de la maladie (Beaugerie *et al.*, 2001).

Parmi les facteurs environnementaux identifiés, l'utilisation des antibiotiques et le régime alimentaire ont un rôle prépondérant dans l'apparition de la dysbiose des patients (Ananthakrishnan, 2015).

L'utilisation des antibiotiques peut impacter la survenue des MICI en fonction de l'âge, de l'antibiotique administré et des doses associées (Faye *et al.*, 2023 ; Hviid *et al.*, 2011; Ungaro *et al.*, 2014). L'exposition aux antibiotiques est significativement associée à la MC avec un OR de 1,74. Paradoxalement, le rôle des antibiotiques n'est pas significatif pour la RCH avec un OR de 1,05. Le type d'antibiotique administré peut influencer sur la survenue de la MC. Le métronidazole (OR = 5,01) et les fluoroquinolones (OR= 1,79) étaient plus fortement associés à la MC (Ungaro *et al.*, 2014). L'effet cumulatif des consommations d'antibiotiques avec la MC a également été démontré (Hviid *et al.*, 2011).

Le régime alimentaire constitue également un facteur favorisant la survenue de la MICI. Un régime alimentaire riche en graisses animales et en cholestérol est associé à la RCH. Un régime de type fast food, riche en graisse et en sucres favorise également la MC (Burisch *et al.*, 2014 ; Reif *et al.*, 1997). Au contraire, une autre étude épidémiologique a révélé le lien protecteur entre une consommation accrue de fibres alimentaires et le développement des MICI (Ananthakrishnan *et al.*, 2013).

L'appendicectomie module également la composition microbienne du patient et suggère un rôle dans l'apparition de la MC (Ananthakrishnan *et al.*, 2013). Une récente étude québécoise d'une cohorte de 400 520 sujets comprenant 2545 cas de MC et 1134 cas de RCH ont confirmé l'hypothèse avec un rapport de risque de 2,02 pour la MC contre un rapport de risque de 0,39 pour la RCH (Fantodji *et al.*, 2022).

1.1.4.4. Facteurs microbiens

Le microbiote intestinal assure un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie intestinale, le métabolisme et l'immunité. Dans un contexte sain, le microbiote agit en symbiose avec l'hôte, le protégeant des agents infectieux et modulant la réponse inflammatoire (Hou *et al.*, 2022). Le microbiote humain présente 6 phyla comprenant les *Firmicutes*, *Bacteroidetes* en majorité mais aussi *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* et *Verrucomicrobia* dont les proportions varient en fonction des changements alimentaires, des infections, des traitements antibiotiques, des xénobiotiques ou de l'âge (Ananthakrishnan *et al.*, 2018 ; Hou *et al.*, 2022).

Dans les MICI, les facteurs génétiques, environnementaux et immunitaires impactent la modulation du microbiote (Figure 5). Plusieurs arguments sont en faveur de l'implication du microbiote dans l'étiologie des MICI. L'antibiothérapie a été associée à une amélioration de l'état clinique du patient (Chassaing & Darfeuille-Michaud, 2011 ; Selby *et al.*, 2007). Une présence accrue d'anticorps aux antigènes microbiens (Mow *et al.*, 2004) ; un défaut de la barrière mucoale entraînant une augmentation de la translocation bactérienne (Keita *et al.*, 2008) ; une diminution des peptides antimicrobiens (Nuding *et al.*, 2007) sont des arguments pouvant prouver l'implication des bactéries commensales ou pathogènes dans la survenue de la MC dans un contexte dysbiotique.

Parallèlement, l'infection d'un agent pathogène pourrait avoir un rôle dans l'initiation et/ou maintien de l'inflammation chronique du patient (Mann et Saeed, 2012). Les bactéries de type *Mycobacterium avium*, *Helicobacter non pylori* et *Campylobacter conscius* sont les potentiels pathogènes associés à la dysbiose des patients MICI (Hansen *et al.*, 2010). A la différence des pathogènes, le pathobionte AIEC impacte l'hôte *via* une activation du système immunitaire indirect (Chassaing *et al.*, 2014 ; Palmela *et al.*, 2018).

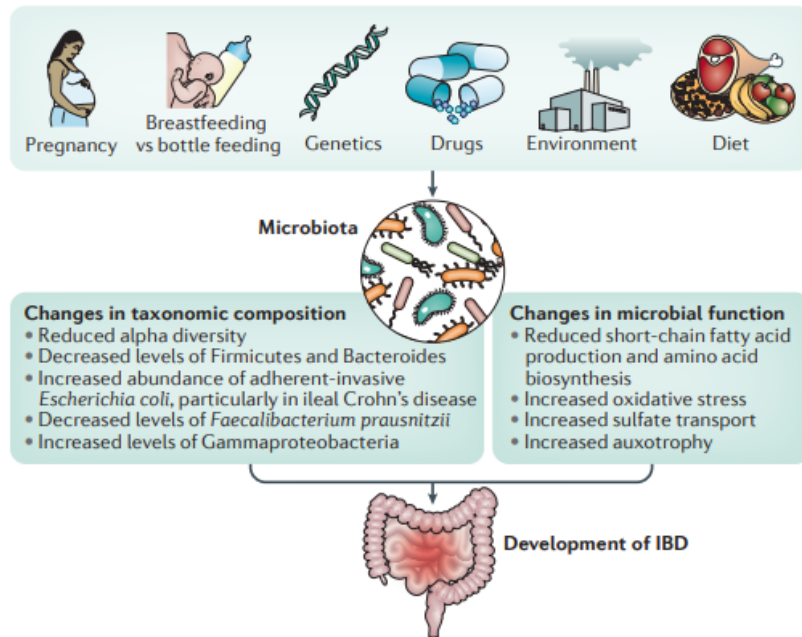


Figure 5. Facteurs modulant le microbiote intestinal (d'après Ananthkrishnan et al., 2018).

Un état dysbiotique (Figure 6) est mentionné chez les patients MICI, caractérisé par une diminution de bactéries symbiotiques (*Bifobacteria*, *Lactobacilli*) au profit des bactéries pro-inflammatoires (*Bacteroides*, *Enterobacterales* dont *Escherichia coli* adhérent et invasif) (Hansen et al., 2010). Une baisse de la diversité alpha et une diminution des *Firmicutes* (dont *Faecalibacterium prausnitzii*) ont également été démontrés (Chassaing & Darfeuille-Michaud, 2011).

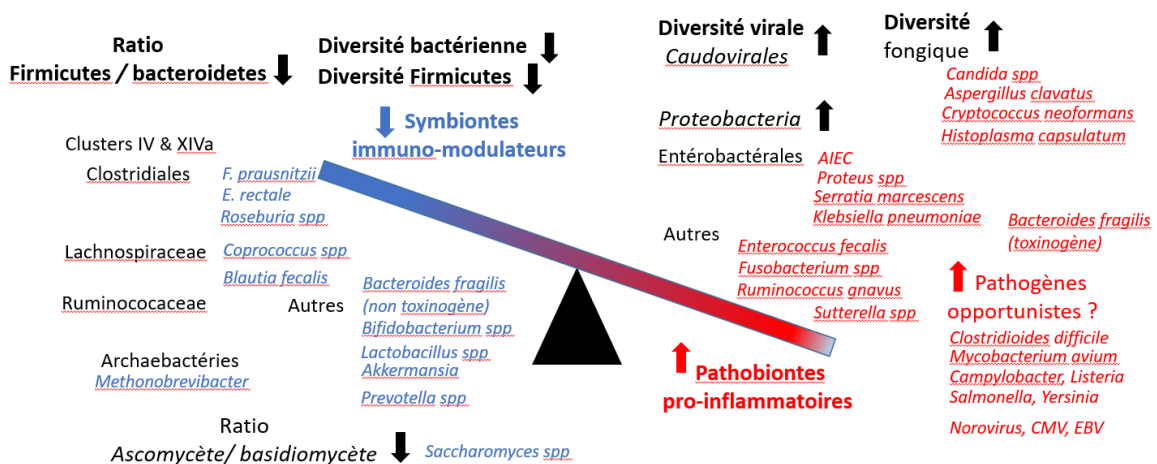


Figure 6. Dysbiose associée aux MICI (d'après Foligné & Titécat, 2020)

Abbréviations : AIEC : *E. coli* adhérent et invasif ; CMV : Cytomégalo virus ; EBV : virus Epstein-Barr

La dysbiose intestinale chez les patients MC et plus particulièrement la diminution de *Faecalibacterium prausnitzii* (Sokol et al., 2008) est associée à une diminution de sécrétion des acides gras à chaîne courtes de type butyrate (Vital et al., 2013). Cette diminution peut induire

une augmentation du stress oxydatif dans le côlon, une réduction de mucines et de peptides anti microbiens ainsi qu'une baisse d'activité anti-inflammatoire (Rivière *et al.*, 2016). La dysrégulation immunitaire peut conduire à l'abondance d'agents pathobiontes dont les AIEC présents au niveau de la muqueuse iléale (Boudeau *et al.*, 1999).

1.2. Les *Escherichia coli* Adhérent et Invasifs (AIEC)

1.2.1. Définition

Identifiée en 1998 à partir d'une biopsie iléale d'un patient atteint de la maladie de Crohn, la souche *Escherichia coli* LF82 est définie comme la souche de référence des AIEC dans la plupart des travaux et a permis de décrire un variant particulier de cette espèce bactérienne, dont les représentants couvrent un large éventail de souches commensales et de pathovars.

A l'échelle phénotypique, les AIEC sont définis par (i) leur capacité à adhérer et envahir les cellules épithéliales intestinales, (ii) leur capacité à survivre au sein des macrophages sans induire une apoptose, (iii) l'absence de gènes de virulence communs aux *E. coli* entéropathogènes. A ce jour, aucun déterminant génétique précis ni marqueur moléculaire ne permet d'identifier une souche *E. coli* comme étant AIEC ou non AIEC (Camprubí-Font & Martínez-Medina, 2020 ; Palmela *et al.*, 2018).

1.2.2. Physiopathologie des AIEC

Jusqu'à présent, les données ne permettent pas de définir le rôle des AIEC comme un agent provocateur ou un facteur aggravant de la MC (Chassaing *et al.*, 2014 ; Palmela *et al.*, 2018). Les récentes études sur la souche AIEC LF82 essentiellement ont permis de comprendre davantage les mécanismes d'action sur l'invasion des cellules épithéliales intestinales, la survie au sein des macrophages dans un contexte favorable.

1.2.2.1. Invasion des cellules épithéliales intestinales

1.2.2.1.1. Accès aux cellules épithéliales intestinales

Dans un intestin sain, le mucus assure une protection intestinale contre les agressions de types mécaniques, chimiques, biologiques favorisant l'homéostasie intestinale. En outre, des agents anti bactériens sont retrouvés au niveau du mucus (lysozyme *Deleted in Malignant*

Brain Tumour 1 - DMBT1, l'immunoglobuline A - IgA, et défensines par exemple) (Paone et Cani, 2020).

Dans un contexte pathologique, la barrière de mucus est altérée. Pour la maladie de Crohn, le mucus est surproduit par les cellules caliciformes, ayant une épaisseur plus importante. La différence réside dans sa composition et l'impact structurel qui en découle. Des défauts de glycosylation et de la sulfatation diminuent l'effet protecteur du mucus chez le patient face aux agents microbiens (Kang *et al.*, 2022 ; Paone et Cani, 2020). S'ajoute à cela une réduction jusqu'à 34% des niveaux totaux de mucine dans la MC (Niv, 2016). L'altération structurelle favorise la colonisation des bactérienne.

Dans ce contexte, l'AIEC possède des avantages pour coloniser les cellules épithéliales intestinales en traversant le mucus des individus. L'une des stratégies proposées est qu'AIEC LF82, la souche de référence des AIEC, possède une activité mucinolytique associée à la protéine Vat-AIEC. A partir d'un test de pénétration sur colonne, la viscosité du mucus est médiée par l'AIEC LF82, favorisant sa pénétration intra-mucosale (Gibold *et al.*, 2016). *In vitro*, AIEC LF82 inhibe l'expression des ARNm des mucines MUC2 et MUC5AC. Ces résultats ont été confirmés pour l'expression de MUC2 *in vivo* à l'aide des souris transgéniques CEABAC10 (Elatrech *et al.*, 2015). La motilité et l'adhésion de l'AIEC LF82 sont assurées par le gène de virulence *fliC* et l'opéron *lpf* respectivement (Barnich *et al.*, 2003 ; Chassaing *et al.*, 2013). L'expression de la protéine LPF peut être régulée par les conditions extérieures (présence de sels biliaires, par exemple). *In vitro*, l'expression de LPF et donc l'invasion d'AIEC LF82 au niveau des plaques de Peyer est augmenté en présence de sels biliaires (Chassaing *et al.*, 2013).

Un autre mécanisme assurant la pérennisation du pathobionte AIEC est sa capacité à résister aux peptides antimicrobiens. La souche AIEC NRG857c résiste aux peptides antimicrobiens grâce à l'îlot de pathogénicité PI-6 contenant 2 gènes codants une protéine de la famille Mig-14 dans la résistance des défensines (*ar1A*) et une protéase de la membrane externe de la famille (*Outer membrane proteases T – OmpT*) (*ar1C*) (McPhee *et al.*, 2014 ; Palmela *et al.*, 2018).

1.2.2.1.2. Adhésion et invasion des cellules épithéliales intestinales

L'adhésion aux cellules épithéliales intestinales est régie par trois mécanismes. L'AIEC peut adhérer aux cellules au travers de l'interaction pili de type 1– CEACAM 6 (*Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 6*), une interaction ChiA – Chitinase-3 like-1 (CHI3L1), ou une interaction aux cellules M *via* la glycoprotéine 2 GP2 et l'adhésine FimH.

L'AIEC LF82 adhère au récepteur CEACAM 6 à la surface apicale des cellules par l'intermédiaire de l'adhésine fimbriale FimH se situant à l'extrémité du pilus de type 1 (Barnich *et al.*, 2003). Une surexpression du récepteur CEACAM 6 associée à une hausse des cytokines pro-inflammatoires est retrouvée chez les patients de Crohn (Barnich *et al.*, 2007). Récemment, une surexpression de CEACAM 6 a été identifiée au niveau des cellules apoptotiques. Ces dernières agiraient comme point d'entrée, permettant à la souche AIEC LF82 de coloniser d'autres cellules épithéliales par translocation (Dumych *et al.*, 2018).

Les AIEC sont également capables d'adhérer au récepteur CHI3L1 exprimé par les cellules épithéliales *via* la protéine bactérienne ChiA dans un contexte inflammatoire. Contrairement aux souris infectées par une souche LF82- Δ chiA, une colite plus sévère était observée chez les souris infectées par LF82 (Low *et al.*, 2013)

Parmi les plaques de Peyer, AIEC LF82 peut envahir les cellules M à l'aide de la protéine LPF (*Long Polar Fimbriae*) ou l'adhésine FimH. Dans le cas d'une adhésion GP2-FimH, la transcytose bactérienne initie une réaction immunitaire mucoale (Chassaing *et al.*, 2013 ; Chassaing & Darfeuille-Michaud, 2011).

Une autre stratégie identifiée à l'aide d'AIEC LF82 requiert la formation de vésicules de membrane externe. La libération des vésicules de membrane externe (OMV) par AIEC LF82 contribue à l'internalisation des bactéries par libération des effecteurs bactériens impliqués dans le réarrangement du cytosquelette des cellules. A travers la glycoprotéine Gp96, les cellules épithéliales reconnaissent les OMV et plus spécifiquement, la protéine bactérienne de membrane externe OmpA. L'interaction par Gp96 est d'autant plus facilitée que son expression est anormalement surexprimée dans la muqueuse iléale des patients de Crohn (Rolhion *et al.*, 2010).

Les différents mécanismes présentés sont indiqués dans la figure ci-dessous (*Figure 7*).

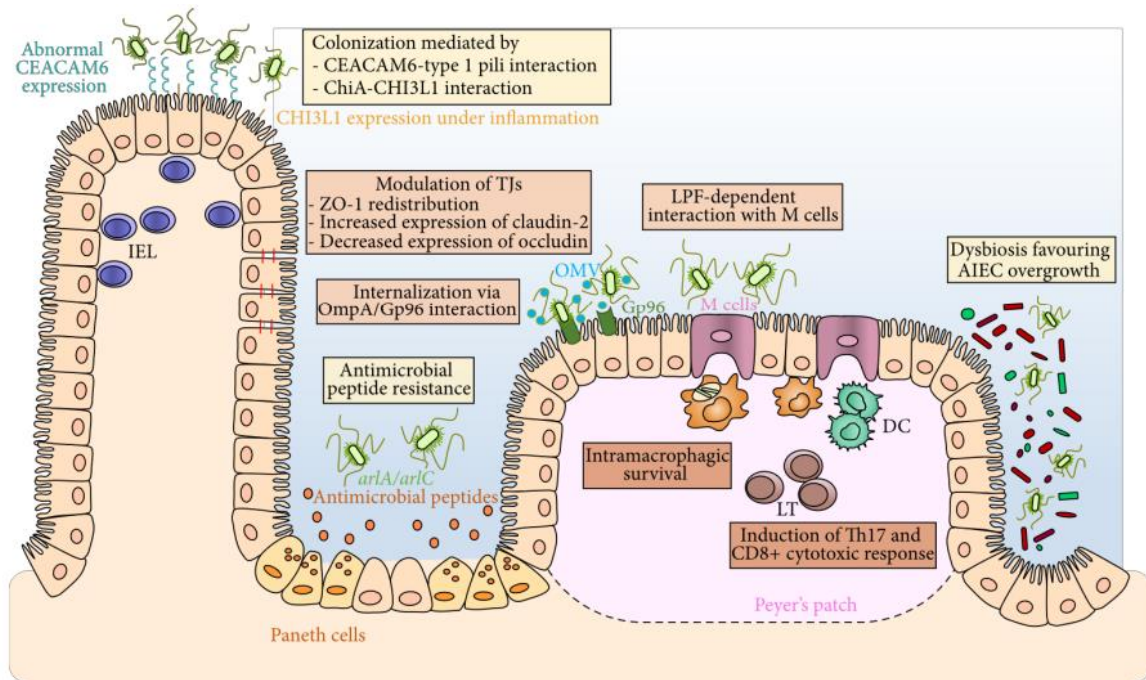


Figure 7. Mécanismes d'adhésion, d'invasion et de survie des AIEC chez un patient Crohn (Agus *et al.*, 2014).

1.2.2.1.3. Effets délétères de l'invasion des AIEC

Au-delà des mécanismes d'adhésion et d'invasion aux cellules épithéliales intestinales, les AIEC peuvent altérer l'homéostasie intestinale. L'adhésion et l'invasion d'AIEC LF82 a été associée à une production d'espèces réactives impliquées dans le stress oxydant (ROS). L'expression des ROS serait liée à l'augmentation d'expression de la NADPH oxydase NOXO1 assurée par AIEC LF82 (Elatrech *et al.*, 2015).

Plusieurs études ont mis en exergue les conséquences de l'AIEC LF82 sur la perméabilité intestinale. En effet, l'infection des cellules Caco-2 différenciées par des AIEC diminuait la résistance transépithéliale électrique, associée à une redistribution des protéines de jonction serrée ZO-1 et E-cadhérine (Sasaki *et al.*, 2007). A partir de tests d'infection de la souche d'AIEC LF82 sur cellules MDCK-1, la redistribution de la protéine ZO-1 a été confirmée. AIEC LF82 semblerait altérer les jonctions serrées épithéliales (Wine *et al.*, 2009). De plus, l'infection par des AIEC sur modèle murin CEABAC10 exprimant les CEACAMs humains, a été associée à une perméabilité intestinale plus élevée et une expression anormale de la claudine-2. Une perméabilité intestinale accrue ainsi qu'une surexpression de CEACAM 6 et de la protéine claudine-2 ont été observés chez les patients atteints de maladie de Crohn (Denizot *et al.*, 2012).

La colonisation des cellules épithéliales intestinales fournit aux AIEC une première niche répliquative. En accord avec le contexte génétique de la MC, AIEC LF82 se réplique dans les cellules Hep-2, HeLa et I-407. Un taux de répllication intra vacuolaire plus élevé d'AIEC LF82 a été mis en évidence sur les cellules HeLa dont l'ATG16L1 ou IRGM étaient inactivées (Lapaquette *et al.*, 2012).

1.2.2.2. Survie au sein des macrophages

1.2.2.2.1. Survie et répllication

L'AIEC, après colonisation des cellules épithéliales intestinales et des cellules M, est phagocyté par les macrophages résidant dans la lamina propria. Des études *in vitro* ont démontré la répllication des AIEC au sein des macrophages associée à une sécrétion accrue de facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) sans induire leur apoptose (Bringer *et al.*, 2005, 2012 ; Buisson *et al.*, 2019). Toutefois, une récente étude a mis en évidence une répllication préférentielle de l'AIEC LF82 au sein des macrophages dérivés de monocytes (MDM) de patients atteints de MC *a contrario* des MDM de patients atteints de colite ulcéreuse ou de témoins sains. Une infection par un *E. coli* non pathogène, ici la souche K12 C600, n'implique pas une répllication plus élevée au sein des MDM de Crohn. Ces derniers résultats étayent l'hypothèse selon laquelle les AIEC peuvent favoriser leurs répllications au sein des macrophages déficients (Elliott *et al.*, 2015) des patients de Crohn (Vazeille *et al.*, 2015). En effet, une des hypothèses émises concerne le défaut d'autophagie relatifs aux variants à risque des gènes impliqués dans la réponse immunitaire (*ATGL6L1*, *IRGM* et *NOD2*) (Elliott *et al.*, 2015).

D'autres études confirment, en comparaison à une souche *E. coli* non pathogène, l'aptitude particulière de l'AIEC LF82 à se répliquer au sein des macrophages murins J774-A1. Les AIEC phagocytés sont internalisés dans les phagosomes. La maturation des phagosomes en phagolysosomes expose ainsi les bactéries internalisées à un environnement acide et à la cathepsine D (Bringer *et al.*, 2006).

L'identification des certains gènes comme *htrA*, *dsbA*, *gipA* ont été associées à la répllication d'AIEC LF82 (Bringer *et al.*, 2005, 2007 ; Vazeille *et al.*, 2016). L'expression de la protéine de stress *htrA* est régulée à la hausse lorsque la bactérie est dans le macrophage ou dans des conditions défavorables comme l'acidité. Cette hausse d'expression, n'étant pas retrouvée pour la souche non pathogène K12, pourrait contribuer à la virulence de l'AIEC.

Toutefois, une délétion du gène *htrA* impacte seulement la réplication d'AIEC LF82. La survie d'AIEC LF82- $\Delta htrA$ ne semble pas être altérée (Bringer *et al.*, 2005). Également, l'acidité et un milieu pauvre en nutriments favorisent la sécrétion d'oxydoréductase *dsbA*, assurant une résistance accrue à la phagocytose de l'AIEC LF82 tant sur la survie que la réplication (Bringer *et al.*, 2007). Une délétion du gène *gipA* a altéré la réplication intracellulaire d'AIEC LF82- $\Delta gipA$ au sein des macrophages murins dérivés de la moelle osseuse (BMDM) et macrophages humains dérivés de monocytes (HMDM). Une diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-6 était associée à la suppression du gène. Des conditions mimant les phagolysosomes, notamment par une quantité accrue de ROS et d'un pH acide, ont favorisé l'expression de *gipA* (Vazeille *et al.*, 2016).

1.2.2.2.2. Persistance, biofilm et tolérance aux antibiotiques

Une récente étude a également mis en évidence la pluralité des stratégies adoptées par AIEC LF82 lors d'une infection de macrophages dérivés de monocytes THP-1. L'existence de multiples états métaboliques bactériens favorise la survie des AIEC (Figure 8). Dans les premières heures d'infection, les conditions de stress sur AIEC LF82 induisent une mort bactérienne élevée, des bactéries non répliquatives et des bactéries persistantes. L'hétérogénéité de la population bactérienne intracellulaire est médiée à la fois par la réponse stringente et la réponse SOS bactérienne. Ces états bactériens sont associés à la phase de latence de l'infection. Le passage à la phase répliquative se traduit par une formation des communautés bactériennes intracellulaires (IBC) associée à une matrice extracellulaire. Dans cette phase, des bactéries répliquatives ou non étaient recensées (Bruder & Espéli, 2022 ; Demarre *et al.*, 2019).

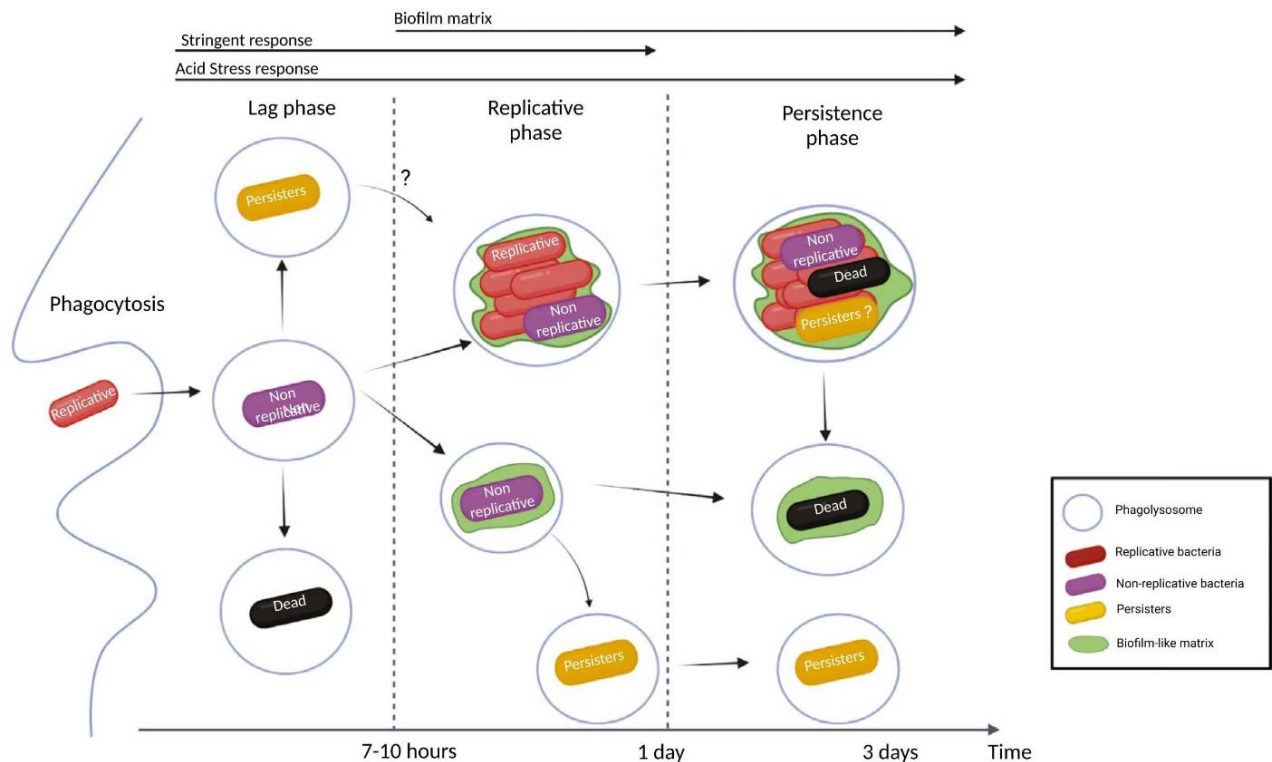


Figure 8. Stratégies utilisées par AIEC LF82 pour survivre dans les macrophages (d'après Bruder et Espéli, 2022).

La transition des bactéries vers un état persistant assure également une tolérance aux antibiotiques comme la ciprofloxacine ou l'ofloxacine, des antibiotiques diffusant au sein des macrophages. Il a été également admis que cet état de tolérance était transitoire et associé à des conditions de stress. Ces récentes découvertes apportent de nouvelles hypothèses concernant les stratégies des AIEC. La faculté d'AIEC à transiter d'un état phénotypique à un autre pourrait contribuer à l'établissement d'un réservoir tolérant aux conditions délétères chez les patients de Crohn (un manque de nutriments ou des traitements antibiotiques) et contribuer à des infections récurrentes (Bruder et Espéli, 2022 ; Demarre *et al.*, 2019).

La formation de biofilm assure aussi un avantage à la survie de la souche AIEC LF82 dans un contexte de phagocytose. Associée à la formation d'une matrice extracellulaire riche en exopolysaccharides, la souche AIEC LF82 forme des microcolonies au sein des phagolysosomes. Une délétion des gènes impliqués dans la production de matrice extracellulaire (*rscBD*, *csgD*) et dans la structuration de la matrice extracellulaire (*pgaA*, *waaWVL*, *wza*) ont impacté la formation ou le maintien des IBC. L'inhibition de la formation de communautés bactériennes intracellulaires chimique par l'acide cis-2-décénoïque impacte également la survie de l'AIEC LF82 au sein des macrophages RAW 264.7

et THP-1. Ces résultats témoignent de l'intérêt du biofilm et de la matrice extracellulaire à la survie de l'AIEC LF82 au sein des macrophages (Demarre *et al.*, 2019 ; Prudent *et al.*, 2021).

1.2.3. Caractérisation des AIEC

1.2.3.1. Tests d'invasion sur lignées cellulaires épithéliales intestinales

L'un des critères phénotypiques définissant les AIEC est leur capacité à envahir les cellules épithéliales intestinales. Un isolat est considéré comme une potentielle souche AIEC si son score d'invasion est supérieur ou égal à 0,1% de l'inoculum infectieux. Ce score d'invasion est généralement déterminé à partir d'un test de protection à la gentamicine, basé sur le ratio obtenu par le dénombrement des bactéries intracellulaires rapportées à l'inoculum de départ (Eaves-Pyles *et al.*, 2008). Ce test d'invasion, dit conventionnel, repose sur une infection des cellules à une multiplicité d'infection (MOI) de 10, d'une durée de 3 heures suivie d'un traitement d'une heure par de la gentamicine à 100 µg/mL (Baumgart *et al.*, 2007 ; Camprubí-Font & Martínez-Medina, 2020 ; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004 ; Martínez-Medina *et al.*, 2009).

Cette méthode d'infection a été reprise par 13 études (Tableau 1). Néanmoins, d'autres études décrivent des méthodologies d'infection différentes en termes de multiplicité d'infection (MOI), de durées d'infection et de paramètres sur le traitement antibiotique (durée, concentration, type) (Boudeau *et al.*, 1999 ; Céspedes *et al.*, 2017 ; Eaves-Pyles *et al.*, 2008 ; Fang *et al.*, 2018 ; Proença *et al.*, 2017).

Une autre variabilité réside dans le type cellulaire utilisé. Parmi les études sur la thématique des AIEC et de l'invasion épithéliale, 8 lignées cellulaires ont été exploitées (I-407, Caco2, Hep2, T84, HCT-8, HT-29a, Hek293). La lignée cellulaire épithéliale intestinale I-407 longtemps utilisée comme lignée de référence est aujourd'hui controversée. En effet, il a été démontré que la lignée I-407 provient de carcinomes cervicaux avec une contamination HeLa (Camprubí-Font et Martínez-Medina, 2020 ; Korch & Capes-Davis, 2021). La lignée Hep2 est aussi une lignée controversée, provenant de carcinomes épithéliaux et issue d'une contamination par des cellules de type HeLa (Camprubí-Font et Martínez-Medina, 2020).

La diversité des méthodes et des lignées cellulaires étudiées induit une variabilité du score d'invasion. Ces différences étaient confirmées ultérieurement par les scores d'invasion hétérogènes entre les cellules I-407 et Hep-2 (Darfeuille *et al.*, 2004) mais aussi entre I-407 et

HT29 (Martin *et al.*, 2004). Cette lignée semblant moins permissive que la lignée I-407 avec laquelle 75% des souches testées étaient invasives contre 27% avec les HT29. Pourtant, les études de prévalence et de caractérisation des AIEC sont régulièrement menées sur des lignées différentes : I-407 (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004 ; Martinez-Medina *et al.*, 2009), Caco-2 (Negroni *et al.*, 2012 ; Conte *et al.*, 2014) ou Hep-2 (Conte *et al.*, 2014) et l'on peut s'interroger sur la reproductibilité des résultats et sur le phénotype avéré d'une souche AIEC lorsque la définition impose un score d'invasion de 0,1%, ce seuil pouvant être considéré comme arbitraire.

Un exemple concret de cette variabilité *in vitro* est l'utilisation de la souche de référence des AIEC LF82. Suivant la méthodologie appliquée, la lignée cellulaire et l'opérateur, le score d'invasion de la LF82 variait de 0,95 % (Conte *et al.*, 2014) à 12,23 % (O'Brien *et al.*, 2016).

Multiplicité d'infection (MOI)	Conditions d'infection	Conditions d'incubation	Référence
10	30 min	3 h avec amikacine 100 µg/mL	Céspedes <i>et al.</i> , 2017
10	1 h	2 h avec gentamicine 100 µg/mL	Eaves-Pyles <i>et al.</i> , 2008
10 ou 20	3 h	1 h avec gentamicine 100 µg/mL	Darfeuille-Michaud <i>et al.</i> , 2004
10	3 h	1h avec gentamicine 3 mg/mL	Boudeau <i>et al.</i> , 1999
100	2 h	1 h avec gentamicine 50 µg/mL	Proença <i>et al.</i> , 2017
100	3 h	1 h avec gentamicine 50 µg/mL	Fang <i>et al.</i> , 2018

Tableau 1. Récapitulatif des différentes conditions d'infection utilisées pour l'invasion des AIEC sur cellules épithéliales intestinales (d'après Camprubí-Font & Martinez-Medina, 2020).

1.2.3.2. Tests de survie sur lignée macrophagique

L'un des critères phénotypiques définissant les AIEC est également leur capacité à survivre au sein des macrophages. Un isolat est considéré comme une potentielle souche AIEC si son taux de survie est supérieur ou égal à 100%. Une qualification supplémentaire est basée sur la capacité de la souche AIEC à survivre (supérieur ou égal à 100% et inférieur à 200%) ou à se répliquer (supérieur ou égal à 200%). Ce taux de survie est généralement déterminé à partir d'un test de protection à la gentamicine, basé sur le ratio obtenu par le dénombrement des bactéries intracellulaires 24 heures après infection rapportées au dénombrement de bactéries intracellulaires obtenu après une heure d'infection suivie d'un premier traitement antibiotique (Camprubí-Font et Martínez-Medina, 2020 ; Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004).

Une disparité réside toutefois dans les conditions d'infection, le traitement antibiotique (durée, concentration, type) ainsi que les lignées cellulaires utilisées (Tableau 2).

Parmi les conditions d'infection, la multiplicité d'infection était de 10, 20 ou 100 suivant les études. Un autre paramètre variable est l'ajout d'une étape de centrifugation à durée et vitesse variables, pouvant médier l'absorption bactérienne. La durée d'infection pouvait également varier de 20 minutes à 2 heures d'infection. Quant au traitement antibiotique, la durée de traitement varie entre 40 minutes et 3 heures, l'évaluation de la survie bactérienne se faisant 24 heures post-infection. L'amikacine, et plus fréquemment la gentamicine sont les antibiotiques employés. Une concentration variant de 20 µg/mL à 3 mg/mL d'antibiotique est employée pour la caractérisation de la survie bactérienne intramacrophagique (Camprubí-Font et Martínez-Medina, 2020).

Parmi les études, l'identification des AIEC se fait majoritairement sur la lignée macrophagique murine J774-A1 (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004). Toutefois, d'autres lignées cellulaires sont employées comme les lignées cellulaires d'origine murine (BMDM, RAW264.7) et d'origine humaine (HMDM, U397, THP-1) (Camprubí-Font et Martínez-Medina, 2020).

MOI	Conditions d'infection	Conditions d'incubation (premier temps)	Conditions d'incubation (second temps)	Référence
10	20 min	40 min avec gentamicine (100 µg/mL)	24 h avec gentamicine (50 µg/mL)	Conte <i>et al.</i> , 2014
10	2 h	3 h avec amikacine (100 µg/ mL)	24 h avec amikacine (100 µg/ mL)	Céspedes <i>et al.</i> , 2017
10	2 h	1 h avec gentamicine (100 µg/mL)	24 h avec gentamicine (20 µg/mL)	Darfeuille-Michaud <i>et al.</i> , 2004
10 ou 100	Centrifugation 10 min à 1000 g et incubation 10 min	40 min avec gentamicine (100 µg/mL)	24 h avec gentamicine (20 µg/mL)	Martinez-Medina, Mora, <i>et al.</i> , 2009
10	Centrifugation 5 min à 500 g et incubation 30 min	2 h avec gentamicine (100 µg/mL)	24 h avec gentamicine (15 µg/mL)	Eaves-Pyles <i>et al.</i> , 2008
20	2 h	1 h avec gentamicine (100 µg/mL)	24 h avec gentamicine (20 µg/mL)	Dogan <i>et al.</i> , 2014
20	2 h	1 h avec gentamicine (100 µg/mL)	24 h avec gentamicine (100 µg/mL)	Raso <i>et al.</i> , 2011
20	2 h	1 h avec gentamicine (3 mg/mL)	1 h avec gentamicine (3 mg/mL)	Boudeau <i>et al.</i> , 1999
100	Centrifugation 10 min à 1000 g et incubation 10 min	1 h avec gentamicine (20 µg/mL)	24 h avec gentamicine (20 µg/mL)	Bringer <i>et al.</i> , 2005
100	2 h	1 h avec gentamicine (50 µg/mL)	24 h avec gentamicine (50 µg/mL)	Proença <i>et al.</i> , 2017

Tableau 2. Récapitulatif des différentes conditions d'infection utilisées pour la survie et réplication des AIEC au sein macrophages (d'après Camprubí-Font & Martinez-Medina, 2020).

1.2.3.3. Exclusion des gènes de virulence de pathovars connus

A l'heure actuelle, malgré la pluralité des études génomiques réalisées et l'identification de gènes de virulence en lien avec le phénotype AIEC, aucun marqueur génétique ne permet de discriminer une AIEC (Camprubí-Font et Martinez-Medina, 2020).

Pour ces raisons, le critère discriminant des AIEC reste l'absence de gènes caractéristiques des *E. coli* entéropathogènes connus associé aux les critères phénotypiques d'invasion et de survie (Bruder et Espéli, 2022).

Parmi ces gènes caractéristiques des pathovars *Escherichia coli* entéropathogène (EPEC), *Escherichia coli* entéroinvasif (EIEC), *Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC), *Escherichia coli* à adhérence diffuse (DAEC), des adhésines, des invasines ou encore des toxines ont été identifiées (Tableau 3).

Virulence	Mécanisme associé	Pathotype	Référence
<i>Stx-1</i>	Toxine Shiga 1	EHEC	Mazel <i>et al.</i> , 2000,
<i>Stx-2</i>	Toxine Shiga 2		Mazel <i>et al.</i> , 2000,
<i>ipaC</i>	Expression du phénotype invasif	EIEC	(Rahmouni <i>et al.</i> , 2018)
<i>estA</i>	Entérotoxine A thermostable	ETEC	(Rahmouni <i>et al.</i> , 2018)
<i>elt</i>	Toxine thermolabile		Mazel <i>et al.</i> , 2000,
<i>tia</i>	Adhésine/invasine	EPEC / UPEC	(Rahmouni <i>et al.</i> , 2018)
<i>bfpa</i>	Piline de type IV	EPEC	Mazel <i>et al.</i> , 2000,
<i>eae</i>	Intimine	EPEC / EHEC	Mazel <i>et al.</i> , 2000,
<i>exhA</i>	Entérohémolysine		Mazel <i>et al.</i> , 2000,
<i>Aggr</i>	Régulateur d'adhérence agrégative	EAEC	Mazel <i>et al.</i> , 2000,
pCVD432	Plasmide associé à l'adhérence agrégative		(Martin <i>et al.</i> , 2004)
<i>afaD</i>	Invasine	DAEC	(Rahmouni <i>et al.</i> , 2018)

Tableau 3. Gènes de virulence caractéristiques des pathovars *E. coli* (adapté de Rahmouni *et al.*, 2018)

1.2.3.4. Présence inconstante d'autres gènes de virulence

Différentes études génomiques sur les AIEC ont permis d'identifier une multitude de gènes de virulence retrouvées chez les AIEC. Les études se sont intéressées à la prévalence des gènes, les mutations des gènes et leur impact ainsi que leur niveau d'expression (Camprubí-Font *et al.*, 2018, 2019, 2020 ; Elhenawy *et al.*, 2021).

Parmi les gènes identifiés, plusieurs gènes étaient impliqués dans (i) dans la traversée du mucus et résistance aux peptides antimicrobiens, (ii) l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales intestinales, (iii) dans la translocation bactérienne et survie au sein des macrophages ([Tableau 4](#)) (Camprubí-Font et Martinez-Medina, 2020).

Gènes impliqués dans la traversée du mucus et peptides antimicrobiens	Mécanisme associé	Référence
<i>iss</i>	Résistance sérique	Camprubí-Font <i>et al.</i> , 2019
<i>vat</i>	Dégradation du mucus	Camprubí-Font <i>et al.</i> , 2019
<i>ar1A / ar1C</i>	Résistance au peptides antimicrobiens	McPhee <i>et al.</i> , 2014

Gènes liés à la survie des macrophages et plaques de Peyer	Mécanisme associé	Référence
<i>gipA</i>	Translocation de l'AIEC à travers les cellules M / réplication au sein des macrophages	Vazeille <i>et al.</i> , 2016
<i>lpfA</i>	Translocation de l'AIEC à travers les cellules M / persistance	Dogan <i>et al.</i> , 2018
<i>colV</i>	Persistance dans les macrophages	Dogan <i>et al.</i> , 2018
<i>dsbA</i>	Résistance accrue à l'acidité des phagolysosomes	Bringer <i>et al.</i> , 2007
<i>pduC</i>	Persistance dans les macrophages	Dogan <i>et al.</i> , 2018
<i>htrA</i>	Résistance au stress oxydatif / réplication au sein des macrophages	Bringer <i>et al.</i> , 2005

Gènes liés à l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales intestinales	Mécanisme associé	Référence
<i>malX</i>	Invasion	Martinez-Medina <i>et al.</i> , 2009
<i>kpsMTII</i>	Formation de capsule	Martinez-Medina <i>et al.</i> , 2009
<i>papGII/III</i>	Adhésion	Camprubí-Font <i>et al.</i> , 2019
<i>ibeA</i>	Invasion	Dogan <i>et al.</i> , 2018
<i>lpfA</i>	Adhésion	Dogan <i>et al.</i> , 2018
<i>fhuD</i> , <i>chuA</i> et <i>irp2</i>	Absorption du fer	Céspedes <i>et al.</i> , 2017
<i>pic</i>	Invasion	Camprubí-Font <i>et al.</i> , 2019
<i>dsbA</i>	Pili de type 1 / flagelles	Bringer <i>et al.</i> , 2007
<i>chiA</i>	Adhésion aux cellules épithéliales intestinales	Low <i>et al.</i> , 2013
<i>colV</i>	Invasion épithéliale	Dogan <i>et al.</i> , 2018
<i>pduC</i>	Invasion épithéliale	Dogan <i>et al.</i> , 2018
<i>fimH</i>	Adhésion	Dreux <i>et al.</i> , 2013
<i>T4SS</i>	Persistance / Biofilm	Elhenawy <i>et al.</i> , 2021
<i>yfgI</i>	Production de vésicules de la membrane externe	Rolhion <i>et al.</i> , 2005

Tableau 4. Gènes impliqués et fonctions associées dans l'invasion épithéliale intestinale et survie macrophagique sur le pathovar AIEC.

Malgré l'identification de divers gènes de virulence associés au pathotype AIEC, la mise en évidence d'une signature génétique des AIEC reste encore un défi.

1.2.4. Les modèles animaux

La caractérisation des AIEC s'est également appuyée sur des modèles animaux. Le modèle le plus utilisé est la souris transgénique CEABAC10, un modèle d'étude murin de la maladie de Crohn dans le contexte des AIEC. Pour étudier les conséquences de l'infection par AIEC, une dysbiose intestinale était induite par administration d'un traitement d'antibiotique à large spectre (streptomycine) et par administration de dextran sulfate de sodium (DSS) pour développer une colite (Carvalho *et al.*, 2009). La particularité de ce modèle est l'expression de l'antigène carcino-embryonnaire humain (CEA). Parmi la famille de gènes CEA humains identifiés, le modèle murin CEABAC10 exprime le récepteur impliqué dans l'adhésion des AIEC, le récepteur CEACAM6 (Chan & Stanners, 2004). L'utilisation de ce modèle a contribué à étayer la compréhension de la pathogénèse des AIEC *in vivo*.

La première étude a mis en évidence la capacité à AIEC LF82 à coloniser et à persister dans le tractus digestif. Cette colonisation s'est également traduite par une colite sévère associée à une perte de poids corporel, de la diarrhée, des saignements rectaux et un taux de survie réduit de 20%. L'inflammation était associée à une hausse de sécrétion cytokiniques pro-inflammatoires de type IL-1 β , IL-6 et IL-17 et une baisse de cytokine anti-inflammatoire IL-10. Comme pour les patients de Crohn, une atteinte des tissus du côlon était identifiée, associée à une expression des récepteurs CEACAM6 (Carvalho *et al.*, 2009). Ce modèle a également mis en évidence le rôle de la modulation de l'expression de la flagelline sur l'adhésion et la colonisation d'AIEC sur le modèle CEABAC10. Une colonisation *in vivo* d'un mutant dépourvu de flagelle LF82- Δ fliC a impacté significativement la colonisation dans le tractus digestif. Étonnamment, une colonisation par un mutant sécrétant de la flagelline LF82- Δ flgM en continu ne permettait pas une colonisation aussi avérée que pour la souche AIEC LF82. L'une des hypothèses serait que la flagelline sécrétée participe fortement à l'adhésion de la bactérie aux cellules de l'épithéliale intestinale. Toutefois, une sécrétion continue serait délétère de par le déclenchement de la réponse immunitaire continue, pouvant lutter contre la bactérie. La modulation possible de la flagelline par AIEC LF82 serait un avantage pour une colonisation dans des conditions bénéfiques (acides biliaires et mucines) et assurerait une colonisation plus efficace et alternée (Sevrin *et al.*, 2020). Le rôle bénéfique de l'angiogenèse et notamment la médiation de l'expression de la protéine du facteur inductible par l'hypoxie HIF-1 α par AIEC LF82 a été aussi éclairée (Mimouna *et al.*, 2011). L'infection par AIEC LF82 réduit l'autophagie en régulant à la hausse les microARN MIR30C et MIR30A. Les microARN réduisent l'expression spécifiquement ATG5 et ATG16L1 (Nguyen *et al.*, 2014). Une perméabilité intestinale avérée associée à une altération de l'intégrité mucosale ont également été démontrés sur la souris transgénique après infection par AIEC LF82. Une surexpression de la protéine claudine-2 pourrait être associée à ces mécanismes physiologiques (Denizot *et al.*, 2012).

Au-delà de cette première approche, le modèle a confirmé l'implication de facteurs environnementaux. Un exemple est le rôle causal d'un régime alimentaire occidental, riche en graisses et sucre dans l'apparition d'une dysbiose, d'une altération de la barrière épithéliale intestinale et de la réponse immunitaire. D'un point de vue tissulaire, une perméabilité intestinale augmentée et une diminution de l'épaisseur de la couche de mucus étaient recensées. Au niveau immunitaire, les gènes impliqués dans l'immunité innée tels que *Tlr5* et

Nod2 étaient augmentés. De plus, une infection à l'AIEC LF82 a contribué à une augmentation de TNF- α (Martinez-Medina *et al.*, 2014).

Ce modèle a été impliqué dans la découverte de méthodes inhibant la colonisation des AIEC (probiotiques, bactériophages). Une première étude a étudié l'effet probiotique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans la modulation de l'infection des AIEC. Une baisse de la colonisation de l'AIEC LF82 associée à un pré-traitement de la levure *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 vivante ou des fractions de la paroi cellulaire, était remarqué. Cet argument était en faveur d'une diminution de la sévérité de la colite, de la réponse pro-inflammatoire et de l'atteinte colique du modèle (Sivignon *et al.*, 2015). L'administration d'un cocktail de bactériophages a également permis de limiter la colonisation de souris CEABAC10 par les AIEC ainsi que les symptômes de colite associés sur une période de suivi de 2 semaines (Galtier *et al.*, 2017).

Un autre modèle murin utilisé est la souris gnotobiotique C3H/HeN dont la particularité réside dans son microbiote (Wymore Brand *et al.*, 2015). Développée par RP Orcutt, les souris gnotobiotiques à flore contrôlée, sont colonisées par un ensemble de 8 espèces bactériennes, transmis de manière stable (Wymore Brand *et al.*, 2015). Le recours à ce modèle permet de confronter la flore altérée de Schaedler (ASF) dépourvue d'entérobactéries, à une infection par 5 *E. coli* présentant un phénotype AIEC *in vitro* dont AIEC LF82. Il a été démontré que le phénotype AIEC observé en *in vitro* était associé à une inflammation intestinale accrue après une exposition au DSS tant sur l'invasion intra-épithéliale sur la lignée Caco-2 que la survie intramacrophagique sur lignée J774-A1. Plus spécifiquement, les souches identifiées comme uniquement capables de survivre sur cellules J774-A1 étaient davantage corrélées à l'état pathologique de la souris. La caractérisation pathologique était basée sur les scores caeaux histopathologiques (l'hyperplasie des glandes, l'effondrement du stroma, l'œdème, l'inflammation cellulaire, l'ulcération et épaisseur de la muqueuse). Une nuance est toutefois portée sur le lien entre la virulence des souches *in vivo* et *in vitro* (Kittana *et al.*, 2023).

Un autre modèle murin est la souris C57BL/6 qui a permis d'étudier les transcriptomes de l'isolat AIEC NRG857c *in vivo* et *in vitro* et évaluer la modulation d'expression des gènes suivant la condition d'infection. L'approche transcriptomique a permis d'apporter une vision complémentaire des gènes exprimés en fonction d'une infection *in vivo* et *in vitro*. Il a été reconnu un avantage métabolique de l'AIEC dans la consommation des sucres hôtes de type

N-acétylglucosamine, le propanediol et le galactitol. Une autre voie métabolique est régulée à la hausse associant la capture du fer avec la virulence des AIEC (Elhenawy *et al.*, 2021). Parmi les sidérophores identifiés, la yersiniabactine a été associée à AIEC LF82 (Dalmasso *et al.*, 2021). Si ces différents modèles murins présentent des intérêts évidents en vues d'études mécanistiques, ils ne peuvent pas être mis en œuvre à grande échelle pour l'identification des AIEC, ne serait-ce que pour des raisons éthiques. Par ailleurs, la diversité des souches d'AIEC a montré que certaines d'entre elles n'utilisaient pas le récepteur CEACAM6 pour faciliter leur entrée.

1.2.5. Les modèles alternatifs de caractérisation des AIEC

Aux vues de la difficulté d'identification des AIEC, une approche alternative en utilisant d'autres modèles *in vitro* et *in vivo* est recherchée et activement souhaitée. Face à ces contraintes, plusieurs équipes essayent d'identifier un nouveau modèle de caractérisation. Le recours à un algorithme de classification basé sur les polymorphismes mononucléotidiques (SNP) associés à l'AIEC a été mis au point pour distinguer à l'échelle moléculaire les AIEC des non AIEC. Cette méthode présentait une spécificité de 82,1 %, une sensibilité de 86,4% et une précision de 84% sur une collection de 50 souches (Camprubí-Font *et al.*, 2018). La confrontation de cet algorithme à d'autres collections issues d'autres régions ou pays (Gérone, Majorque, France, Chili et Australie) n'a pas abouti sur les mêmes évaluations statistiques prédictives. Le recours à cet algorithme pour l'ensemble des souches (n=184) provenant des régions présentaient une spécificité (74,5 %), une sensibilité (45,4 %) et une précision (60,9%) moindre. A ce jour, cette méthode ne semble pas être universelle et nécessite des études supplémentaires. Pour améliorer la puissance et la robustesse du test, les stratégies proposées sont l'inclusion d'un plus grand nombre de souches AIEC, non-AIEC, *E. coli* pathogènes intestinaux et *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (Camprubí-Font *et al.*, 2020).

Une autre étude métagénomique s'est intéressée à une détection des biomarqueurs moléculaires associée aux *Escherichia coli* adhérents et invasifs chez les patients atteints de la maladie de Crohn. Plusieurs cohortes (MOBIDIC, CrohnOmeter, PREDICT) ont contribué à l'identification de biomarqueurs. A partir d'une analyse métagénomique d'échantillons fécaux de 358 patients et 43 volontaires sains, le principe de l'étude était d'évaluer un biomarqueur en lien avec l'activité de la maladie. L'activité de la maladie était basée, selon les cohortes, sur l'indice de Harvey Bradshaw (HBI), le taux de calprotectine fécale, le taux de protéine C-réactive (CRP) et les scores endoscopiques. Une abondance significativement plus élevée d'*E.*

coli et d'*Enterobacteriaceae spp* ont été retrouvés chez les patients de Crohn. Plus spécifiquement, la présence accrue de bactéries exprimant *FimH* était en lien avec l'état de la maladie. La protéine FimH, présentant un rôle dans la colonisation des AIEC au travers du mucus, la diminution de l'épaisseur du mucus, l'adhérence et l'inflammation épithéliale, fait l'objet d'une nouvelle étude en cours. L'étude clinique porte sur l'effet thérapeutique du blocage de FimH pour traiter les patients de Crohn (Chevalier *et al.*, 2021).

En lien avec la caractérisation des AIEC, une autre équipe s'intéresse à la découverte de méthodes rapides et moins invasives qu'une biopsie iléale pour détecter la colonisation iléale par AIEC chez les patients atteints de la maladie de Crohn. A ce stade, les résultats confirment la nécessité de réaliser des biopsies iléales pour la détection d'AIEC. En effet, une absence de corrélation a été démontrée entre le dénombrement des *E. coli* fécaux et la proportion de colonisation iléale des AIEC. Face à ces résultats, une alternative est proposée pour valider une colonisation ou non des AIEC chez les patients. L'autre stratégie de détection serait la mesure du taux sérique du niveau d'anticorps anti-*E. coli*. Le recours à ce test permet une exclusion de la colonisation des AIEC chez le patient, associant une valeur prédictive négative élevée. Toutefois, il ne permet pas de détecter les patients positifs à l'AIEC avec une valeur prédictive positive élevée (Buisson *et al.*, 2021).

Face à ces contraintes, notre position était d'entrevoir d'autres stratégies pour proposer de nouvelles méthodes d'identifications des AIEC *in vitro* et *in vivo*.

1.2.5.1. Approche *in vitro* : l'imagerie à haut contenu (HCS)

Depuis les années 1990, le criblage à haut contenu est devenu un outil de recherche dont les domaines d'applications s'étendent de la biologie cellulaire à la découverte de médicaments. Au cours des dernières années le champ d'utilisation du HCS s'est considérablement étendu au sein des laboratoires de recherches académiques. La technologie de criblage à haut contenu combine la microscopie automatisée à l'analyse qualitative et quantitative d'images. En s'appuyant sur des tests phénotypiques miniaturisés et la fluorescence (anticorps, sondes fluorescentes), l'imagerie à haut contenu permet de visualiser les structures cellulaires et subcellulaires (noyau, actine, mitochondrie, autophagosome, appareil de Golgi par exemple) mais également des micro-organismes (Brodin *et al.*, 2015).

Le processus se décompose en 4 étapes : (1) la phase de développement et de miniaturisation du test phénotypique avec détection des cellules par microscopie

automatisée, (2) la phase d'automatisation qui consiste à la robotisation de l'essai, (3) la phase de criblage incluant l'acquisition et l'analyse d'images, ainsi que le stockage des données et (4) une étape finale d'analyse statistique des données (*Figure 9A*). Les appareils sont tous adaptés à l'acquisition d'images de tests réalisés en microplaques de 96 à 1536 puits. Ils détectent une large gamme de longueur d'ondes fluorescentes et permettent d'observer les cellules à différents grossissements (de x2 à x 60). L'analyse d'images est une étape clé et automatisée grâce à l'utilisation de logiciels adaptés (ex : ColumbusTM - Perkin Elmer) (*Figure 9B*). Elle permet de connaître le nombre de cellules, leurs caractéristiques morphologiques (taille, forme), le diamètre des compartiments subcellulaires, le repérage de micro-organismes intracellulaires. Le nombre d'images acquises lors du criblage phénotypique est très variable et dépend du format de la plaque utilisée, ainsi une seule microplaque 384 puits peut aboutir à l'acquisition de plus de 6000 images. Elles sont ensuite stockées afin d'en extraire les informations. Le criblage à haut contenu a déjà été employé dans la littérature afin de caractériser des bactéries entéropathogènes du genre *Salmonella*. Cette technique permet notamment de déterminer les paramètres cellulaires et bactériens impliqués dans l'infection de cellules épithéliales (*Voznica et al., 2018*) et d'analyser la répliation de différentes souches dans les macrophages (*Wu et al., 2014*). Ces travaux démontrent la faisabilité de la méthode et sa possible transposition à l'étude des AIEC. Cette approche est de fait la stratégie que nous avons choisie de développer et d'éprouver dans le cadre de cette thèse.

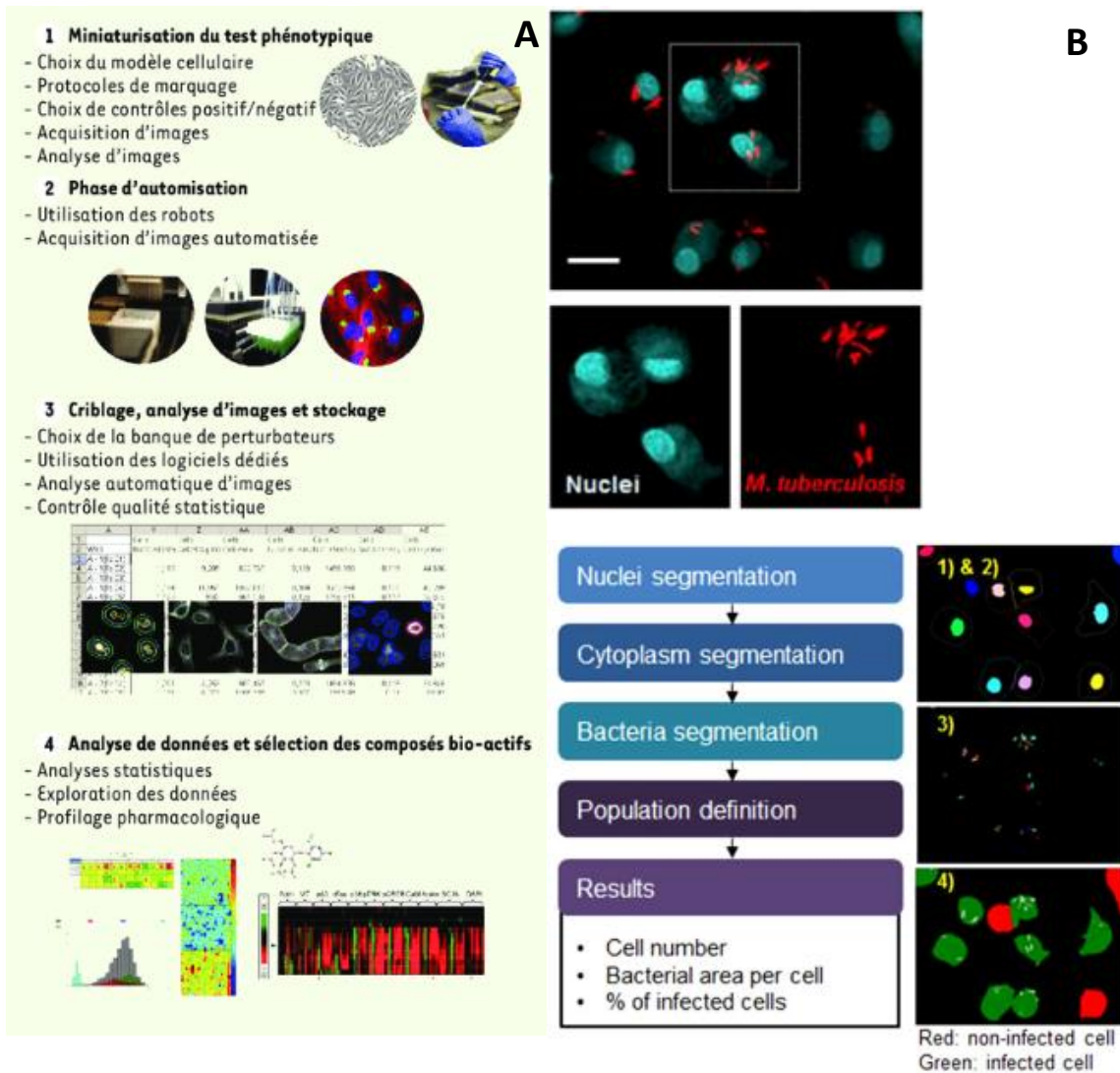


Figure 9. Les différentes étapes du processus de l'imagerie à haut contenu appliquées au criblage de molécules pharmaceutique (A - d'après Brodin et al., 2015) et à la détection de micro-organismes intra-cellulaires (B - d'après Song et al., 2017).

1.2.5.2. Approche *in vivo* : le nématode *Caenorhabditis elegans*

Le ver *Caenorhabditis elegans* est un nématode hermaphrodite, d'un millimètre de longueur. Ce bactériophage se trouve dans le sol, les matières végétales et les fruits, riches en micro-organismes. De par sa facilité d'entretien et à le nourrir, le ver représente un bon modèle d'étude en biologie. Sa simplicité ainsi que la durée de vie relativement courte permettent de l'appliquer dans des champs comme la biologie du vieillissement, la neurologie, la génétique ou l'infectiologie (Gerbaba et al., 2017). Le cycle de développement du nématode se subdivise en 4 stades larvaires (du stade L1 au stade L4) à 25°C durant 3 jours. Le stade adulte peut durer jusqu'à 2 semaines. Dans un laboratoire, le nématode se nourrit habituellement de la souche auxotrophe *E. coli* OP50 comme source de carbone, d'azote et de nutriments.

A ce jour, le modèle représente un modèle simplifié d'interaction hôte pathogène et a permis d'étudier une diversité de pathogènes bactériens. Bien que l'interaction immunité adaptative et pathogène ne puisse pas être élucidé, le modèle a permis l'identification de facteurs de virulence et de toxicité sur différents agents bactériens. Parmi eux, plusieurs bactéries pathogènes humaines comme *Pseudomonas aeruginosa* (Tan *et al.*, 1999), *Salmonella enterica* (Aballay *et al.*, 2000), *Staphylococcus aureus* (Sifri *et al.*, 2003), *E. coli* entéropathogène (Mellies *et al.*, 2006) et *E. coli* uropathogène ont été étudiées (Hashimoto *et al.*, 2019 ; Schifano *et al.*, 2018).

Au-delà des agents pathogènes étudiés, le modèle *C. elegans* constitue un modèle robuste dans l'implication de l'immunité innée, les cellules épithéliales intestinales et les interactions hôte pathogènes. En effet, les 20 cellules intestinales qui le constituent disposent de multiples similitudes morphologiques et fonctionnelles avec les cellules épithéliales intestinales de mammifères (Rivera *et al.*, 2022 ; Gerbaba *et al.*, 2017).

Une première étude a utilisé le modèle *C. elegans* pour évaluer l'impact de l'invasion AIEC LF82. Plus spécifiquement, en appui avec l'identification de facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* différent des tests d'infection *in vitro*, l'intérêt était de pouvoir identifier d'autres facteurs de virulence d'AIEC LF82. L'infection par AIEC LF82 conduit à une létalité du ver plus rapide qu'une infection par *E. coli* OP50. Le recours à ce modèle a permis d'étudier différents mutants et leur implication dans la pathogénèse des AIEC. Contrairement aux tests d'infection sur cellules épithéliales intestinales, la virulence de la souche AIEC LF82 n'était pas diminuée avec les délétions des gènes *htrA*, *dsbA* ou *fimH*. Toutefois, une délétion du gène *hfq* affecte l'expression d'une centaine de gènes, rendant la souche AIEC LF82- Δhfq significativement moins virulente. L'utilisation de ce modèle a mis en évidence le rôle fonctionnel de la protéine hfq dans la colonisation des cellules épithéliales intestinales et la survie intramacrophagique *in vitro* (Mazel *et al.*, 2000 ; Simonsen *et al.*, 2011)

Nous reprendrons ce modèle original et exploratoire pour différentes souches d'*E. coli*, AIEC ou non AIEC, dans une partie de ce travail de thèse.

PROBLÉMATIQUE ET STRATÉGIES D'ÉTUDE

A ce jour, la caractérisation des AIEC reste controversée de par une diversité de lignées cellulaires épithéliales et macrophagiques utilisées ainsi que les protocoles associés. A cela, s'ajoute l'absence de trait génotypique définissant le pathovar AIEC. La caractérisation par tests phénotypiques utilisant des techniques longues et fastidieuses comme la culture cellulaire et le dénombrement bactérien sur des plaques de culture de 24 puits limite également le nombre de souches analysées au cours d'une même expérience, et au-delà, limite le nombre de souches analysées pour un même sujet dans les études de prévalence. Aussi, la caractérisation de ce pathobionte à l'heure actuelle n'est pas standardisée et manque de reproductibilité.

L'objectif principal de notre travail est d'évaluer une approche *in vitro* et *in vivo* pour caractériser les AIEC de manière la plus efficace possible. Ainsi, nous avons eu recours successivement au modèle *Caenorhabditis elegans* en tant que modèle d'étude hôte pathogène pour discriminer un nombre substantiel de souches d'*E. coli*. Dans un but de reproductibilité, de robustesse et d'automatisation, une proposition de caractérisation des AIEC par imagerie à haut contenu a été également étudiée.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1. TESTS CONVENTIONNELS D'IDENTIFICATION DES AIEC

3.1.1. Bactéries et conditions de culture

Pour les expériences, les bactéries étaient cultivées sur des milieux de Luria Bertani (LB) gélosés ou en bouillon. Les 70 souches de la collection de référence ECOR ont été étudiées. La collection ECOR regroupe des souches isolées de fèces d'individus et d'animaux sains de différentes régions géographiques du monde, représentatives de la diversité génotypique de *E. coli* (Ochman et Selander, 1984). Parallèlement, 40 souches cliniques isolées de fèces de patients malades de Crohn (collection du laboratoire) ont été caractérisées. La souche *E. coli* LF82 est considérée comme la souche de référence AIEC (Darfeuille-Michaud et al., 1998). La souche *E. coli* Nissle 1917 est considérée comme un probiotique pour traiter différents troubles gastro-intestinaux (Massip et al., 2019). Les souches de référence LF82 et Nissle 1917 ont été employées en tant que témoin positif et négatif respectivement, pour les expériences d'invasion.

3.1.2. Lignées cellulaires et entretien

La lignée cellulaire épithéliale utilisée pour les tests phénotypiques était l'« Intestine 407 » (I-407) (ATCC CCL-6™), la plus couramment employée pour caractériser les AIEC. Les cellules étaient cultivées à 37°C dans une atmosphère humide enrichie à 5% en CO₂ dans du milieu de culture Basal Medium Eagle (BME ; Gibco, Paisley, Royaume - Uni) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal défibriné (SVF ; Eurobio Scientific, France), 1% de L-glutamine (Thermofisher, Ilkirch, France) et 1% de Pénicilline/Streptomycine (Thermofisher, Ilkirch, France).

Une autre lignée cellulaire épithéliale utilisée pour les tests phénotypiques était la lignée Caco-2/TC-7 (SCC209, Sigma-Aldrich). Les cellules étaient cultivées dans une atmosphère humide enrichie à 5% en CO₂ dans du milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM ; Gibco, Paisley, Royaume - Uni) GlutaMAX™ supplémenté de 10% de SVF (Lonza, Basel, Suisse). La lignée cellulaire humaine d'adénocarcinome du côlon Caco-2/TC-7 a été isolée à partir d'un passage tardif de la lignée cellulaire Caco-2. Elle comprend une population plus homogène et présente les fonctions caractéristiques des entérocytes de l'intestin grêle.

Pour la caractérisation des *E. coli* sur macrophages, nous avons choisi de travailler sur la lignée macrophagique murine J774-A1 (ATCC TIB-67). Les cellules étaient cultivées dans une atmosphère humide enrichie à 5% de CO₂ dans du milieu de culture Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI ; Gibco, Paisley, Royaume - Uni) – 1640 GlutaMAX™ supplémenté de 10% de sérum de veau foetal défibriné (SVF ; Lonza, Basel, Suisse) sans antibiotique.

3.1.3. Tests d'invasion sur lignées cellulaires épithéliales intestinales

La veille de l'expérience, les cellules I-407 étaient traitées par la trypsine durant 2 minutes à 37°C en atmosphère humide enrichie à 5% de CO₂. Après inactivation de la trypsine par ajout d'un volume équivalent de milieu, les cellules étaient centrifugées à 500 rpm durant 5 minutes à température ambiante. Le culot était ensuite resuspendu dans un volume 10 ml de BME sans antibiotique. Les cellules étaient dénombrées sur une cellule de Thoma après dilution au ½ d'un volume de la suspension cellulaire dans du bleu de trypan. Un volume contenant 4×10^5 cellules était déposé dans chaque puits d'une plaque de 24 puits (Sarstedt™, Nümbrecht, Allemagne) puis incubé pendant 20 heures à 37°C sous une atmosphère humide enrichie à 5% en CO₂. Le jour de l'expérience, les cellules étaient mises en contact avec des suspensions bactériennes en phase de croissance exponentielle à raison de 4×10^6 bactéries, soit une multiplicité d'infection (MOI) de 10. La plaque était ensuite centrifugée à 1000 rpm durant 2 minutes afin de synchroniser l'infection par les différentes souches testées, puis incubée à 37°C sous une atmosphère humide enrichie à 5% en CO₂ durant 3 heures. Les cellules infectées étaient ensuite lavées 3 fois avec du PBS 1X stérile réchauffé à 37°C, puis traitées par du milieu supplémenté à 100 µg/mL de gentamicine (GM) afin d'éliminer les bactéries extra-cellulaires. Au terme d'une heure d'incubation à 37°C, les cellules étaient lavées 3 fois dans du PBS 1X stérile puis lysées mécaniquement dans une suspension de PBS 1X/Triton X100 1% (Sigma Chemical Company). Cinq microlitres de chaque puits étaient ensuite étalés sur milieux gélosés directement (pur) puis après 5 dilutions sériées au 1/10ème. Après une incubation de 24h à 37°C, les colonies issues des suspensions bactériennes initiales (inoculum initial) et des lysats cellulaires (inoculum final) étaient dénombrées. Une souche était considérée invasive lorsque le rapport : (inoculum final / inoculum initial) x100 était $\geq 0,1\%$. Les souches LF82 et Nissle 1917 étaient associées à chaque expérience à titre de témoins positif et négatif respectivement.

Les tests d'invasion sur lignée Caco-2/TC-7 étaient similaires aux tests d'invasion sur lignée I-407. Toutefois, la densité cellulaire de dépôt était de 3×10^5 cellules dans chaque puits d'une plaque de 24 puits. L'autre différence réside dans l'utilisation du milieu cellulaire Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) sans antibiotique.

3.1.4. Test de survie sur lignée macrophagique murine

La veille de l'expérience, les cellules J774-A1 étaient traitées par l'acutase durant 1 minute à 37°C en atmosphère humide enrichie à 5% de CO₂. Après inactivation de l'acutase par ajout du double de volume de milieu RPMI, les cellules étaient centrifugées à 800 rpm durant 5 minutes à température ambiante. Le culot était ensuite resuspendu dans un volume 10 ml de RPMI sans antibiotique. Les cellules étaient dénombrées sur une cellule de Thoma après dilution au 1/2 d'un volume de la suspension cellulaire dans du bleu de trypan. Un volume contenant 2×10^5 cellules était déposé dans chaque puits d'une plaque de 24 puits (Sarstedt TM, Nümbrecht, Allemagne) puis incubé pendant 20 heures à 37°C sous une atmosphère humide enrichie à 5% en CO₂. Le jour de l'expérience, les cellules étaient mises en contact avec des suspensions bactériennes en phase de croissance exponentielle à raison de 4×10^6 bactéries, soit une multiplicité d'infection (MOI) de 10. La plaque était ensuite centrifugée à 1000 rpm durant 5 minutes afin de synchroniser la phagocytose par les différentes souches testées, puis incubée à 37°C sous une atmosphère humide enrichie à 5% en CO₂ durant 1 heure. Après 3 lavages au PBS 1X réchauffé, les bactéries non phagocytées par les macrophages étaient éliminées par un traitement d'une heure à la gentamicine (100µg/mL - Gibco), remplacé par une suspension à 20 µg/ml lorsque l'infection était prolongée à 24h. Les bactéries intracellulaires étaient quantifiées de la même manière que celle décrite dans les essais d'invasion après 1h et 24h d'infection. Les résultats étaient exprimés en pourcentage de bactéries retrouvées après 1h et 24h post-infection. L'index de réplication était défini comme suit : $I_REPL (\%) = (UFC.ml^{-1} \text{ à } 24h / UFC.ml^{-1} \text{ à } 1h) \times 100$. Une AIEC étant définie par un score d'invasion supérieur à 0,1% et un pourcentage de survie ou de réplication supérieur ou égal à 100% et 200 % respectivement.

3.1.5. Génotypage de la virulence par RT-PCR quantitative

L'absence ou la présence des gènes de virulence associés aux *E. coli* entéro-pathogènes a été validée par PCR en temps réel en employant le réactif Sybr Green (ThermoFisher, Courtaboeuf, France) à l'aide de l'automate QuantStudio3 (LifeTechnologies, Courtaboeuf, France). Les gènes de virulences étudiés recouvraient l'ensemble des *E. coli* entéro-pathogènes. Les cibles et amorces sont détaillées dans le tableau ci-dessous ([Tableau 5](#)). Pour l'ensemble des souches, un thermolysat était obtenu à partir d'une colonie remise en suspension à dans 50 µL d'eau ultrapure. La solution était portée à 95°C pendant 20 minutes et centrifugée à 4000 rpm pendant 5 minutes. Deux microlitres du surnageant étaient ajoutés au mélange réactionnel dont le volume final était de 12 µL. Les concentrations finales d'amorce étaient de 200 nM (*stx-1*, *stx-2*, *ipaC*, *PCVD 432 afaD*, *tia*), 300 nM (*est*, *bfp*, *ehxA*, *aggR*) et 900 nM (*elt*, *eae*). Des extraits d'ADN de souches de référence de *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC, EHEC, EAEC, EIEC, DAEC) ont été employés comme témoins positifs.

Gènes	Pathotype	Séquence des oligonucléotides (5' -3')	Taille de l'amplicon (bp)	Référence
<i>Stx-1</i>	EHEC	Fwd: GCAAAGAMGTATGTWGATTCG Rev: GWGCCACTATCAATCATCAG	107	Mazel <i>et al.</i> , 2000,
<i>Stx-2</i>		Fwd: AATGCAAATCAGTCGTCAC Rev: TGCATCTCTGGTCATTGTAT	82	Mazel <i>et al.</i> , 2000,
<i>ipaC</i>	EIEC	Fwd: CCTCACCACAACTAACTCTAGCA Rev: TGCTGCGCAGAAAGGGTATT	175	(Rahmouni <i>et al.</i> , 2018)
<i>estA</i>	ETEC	Fwd: CACCTTTCGCTCAGGATGCT Rev: TTCATGCTTTCAGGACTACTTTCATT	115	(Rahmouni <i>et al.</i> , 2018)
<i>elt</i>		Fwd: GGYAAAAGAGAAATGGTTAT Rev: TCTCGGTCAGATATGYGATTC	142	Mazel <i>et al.</i> , 2000,
<i>tia</i>	ETEC / UPEC	Fwd: GGGTTATGCACGGGTACATCA Rev: GCCAGATTCATTCCAGGAGGTA	61	(Rahmouni <i>et al.</i> , 2018)
<i>bfpa</i>	EPEC	Fwd: CMGGTGTGATGTTTTACTAC Rev: TGCCCAATATACARACCAT	109	Mazel <i>et al.</i> , 2000,
<i>eae</i>	EPEC / EHEC	Fwd: GCTATAACRTCTTCATTGATC Rev: RCTACTTTTTRAAATAGTCTCG	92	Mazel <i>et al.</i> , 2000,
<i>exhA</i>		Fwd: GCACCACAACCTTGAYAACT Rev: CCAGATTATTACCTACATTYTCAG	86	Mazel <i>et al.</i> , 2000,
<i>aggR</i>	EAEC	Fwd: TTTATCGCAATCAGATTAARC Rev: GGACAACRCAAGCATCTAC	94	Mazel <i>et al.</i> , 2000,
pCVD432		Fwd: AGACTCTGGCGAAAGACTGTATC Rev: ATGGCTGTCTGTAATAGATGAGAAC	194	(Martin <i>et al.</i> , 2004)
<i>afaD</i>	DAEC	Fwd: CGCACACGGGTTTTTCATGT Rev: CCCCCTCCCGCCTTCT	153	(Rahmouni <i>et al.</i> , 2018)

Tableau 5. Amorces employées pour la détection des gènes de virulence.

3.2. Tests de formation de biofilm

L'un des traits caractéristiques des AIEC est leur capacité à produire du biofilm (Martinez-Medina *et al.*, 2009 ; Chassaing et Darfeuille-Michaud, 2013 ; Prudent *et al.*, 2021). Les tests de formation de biofilm ont été réalisés sur l'ensemble des souches, selon une méthode décrite auparavant (Stepanovic *et al.*, 2000) avec quelques modifications. Les souches étaient cultivées pendant une nuit à 37°C sur une gélose Luria-Bertani (LB). Le lendemain, les colonies bactériennes étaient suspendues en milieu LB liquide à 37°C sous agitation. Pour des raisons de calibration et de la quantification de biofilms, les suspensions bactériennes devaient présenter une turbidité allant de 0,9 à 1,1 Mac Farland. Dans chaque puits, une suspension bactérienne diluée au 1 : 20 dans du milieu LB liquide était déposée pour un volume final de 200µL. Le dépôt des suspensions bactériennes étaient réalisées sur 3 puits sur plaques 96 puits à fond plat CytoOne® (Starlab, Japan). Les suspensions bactériennes étaient incubées pendant 48 heures à 37°C sans agitation. Au terme de cette incubation, 3 lavages au PBS1X (volume final de 300µL) ont été réalisés. Les plaques étaient déposées sur plaque chauffante Slide Drying Bench (Thermo Scientific™, Etats-Unis) durant 1 heure à 80°C. Les bactéries adhérentes étaient colorées avec 150µL de crystal violet solubilisé à 2% dans du méthanol, pendant 15 minutes à température ambiante. Le surplus du colorant était éliminé par rinçage à l'eau osmosée. Après une étape de séchage à l'air libre, les puits étaient fixés à l'éthanol 95% en agitation à 180 pendant 20 minutes. Les mesures de biofilm étaient réalisées à l'aide du lecteur de plaque CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Allemagne) à une DO à 570 nm. Pour chaque plaque, 3 puits témoins colorés contenant uniquement du milieu LB liquide étaient déposés. Par souche, la formation de biofilm était évaluée en triplicat. Le degré de production de biofilm était subdivisé en trois catégories : faible ($IFB < 0,16$), modéré ($0,16 \leq IFB < 0,33$) et fort ($IFB \geq 0,33$).

En vue d'une adéquation avec le test d'infection sur cellules épithéliales intestinales, des mesures de biofilm ont été réalisées après une incubation de 3 heures à 37°C. Dans ce cas, le degré de production de biofilm était subdivisé en trois catégories : faible ($IFB < 0,14$), modéré ($0,14 \leq IFB < 0,28$) et fort ($IFB \geq 0,33$).

3.3. Tests d'invasion par HCS

3.3.1. Tests d'invasion sur lignées cellulaires épithéliales intestinales

La veille de l'expérience, les cellules I-407 étaient traitées par la trypsine durant 2 minutes à 37°C en atmosphère humide enrichie à 5% de CO₂. Après inactivation de la trypsine par ajout d'un volume équivalent de milieu, les cellules étaient centrifugées à 500 rpm durant 5 minutes à température ambiante. Le culot était ensuite resuspendu dans un volume 10 ml de BME sans antibiotique. Les cellules étaient dénombrées sur une cellule de Thoma après dilution au ½ d'un volume de la suspension cellulaire dans du bleu de trypan. Les cellules étaient dispensées à l'aide de l'automate Multidrop™ (Thermo Scientific™, Etats-Unis). Un volume de 40 µL avec une densité s'élevant à 3000 cellules était déposé dans chaque puits d'une plaque de 384 puits (Greiner Bio One, Allemagne) puis incubé pendant 20 heures à 37°C sous une atmosphère humide enrichie à 5% en CO₂. Le lendemain, la densité optique des souches était calibrée pour atteindre une DO s'élevant à 0,2 pour un volume final de 1 millilitre. L'infection des cellules était réalisée à l'aide de l'automate Precision (BioTek, France). Pour chaque souche, un volume de 20 µL de la suspension bactérienne était dispensé sur 4 puits autorisant une infection à MOI 50 et un volume de 4 µL sur 4 puits pour une infection à MOI 10. Les souches LF82 et Nissle 1917 étaient associées à chaque expérience à titre de témoins positif et négatif respectivement. La plaque était ensuite centrifugée à 1000 rpm durant 2 minutes afin de synchroniser l'infection par les différentes souches testées, puis incubée à 37°C sous une atmosphère humide enrichie à 5% en CO₂ durant 3 heures. A l'issue de cette centrifugation, les étapes suivantes étaient réalisées à l'aide de l'automate Multidrop™ (Thermo Scientific™, Etats-Unis). Par puits, un volume final de 50µL était déposé sur les cellules (lavages, fixation) et un volume final de 30 µL était déposé pour les étapes de marquages fluorescents. Les cellules infectées étaient ensuite lavées 3 fois avec du PBS 1X stérile réchauffé à 37°C, puis traitées par du milieu supplémenté à 100 µg/mL de gentamicine (GM) afin d'éliminer les bactéries extra-cellulaires. Au terme d'une heure d'incubation à 37°C, les cellules étaient lavées 3 fois dans du PBS 1X stérile. Les cellules étaient fixées à la PFA 4% à température ambiante durant 20 minutes. Une étape de perméabilisation cellulaire était réalisée durant 5 minutes au PBS 1X/Triton X100 0,1% (Sigma Chemical Company). Un mélange réactionnel PBS1X et SVF à une dilution au 1 : 10 pendant 30 minutes était ensuite déposé sur les cellules. Un anticorps polyclonal primaire de lapin anti-LPS (ThermoFisher,

Illkirch, France) dilué au 1 : 5000 dans la solution PBS1X/SVF 10% était ensuite maintenu 4°C pendant 18 heures. Le lendemain de l'expérience, 3 rinçages au PBS1X et Tween20 à une dilution au 1 : 1000 étaient effectués avant l'étape de marquage fluorescent. Les cellules étaient ensuite incubées à l'obscurité 1 heure en contact avec un mélange réactionnel avec l'anticorps secondaire IgG de chèvre anti-lapin (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1 : 5000) (ThermoFisher, Illkirch, France), un marqueur nucléaire 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (1 : 12000) et un marqueur du cytoplasme bleu HCS Cell Mask™ Blue Stain (Life technologies (ThermoFisher, Illkirch, France). Un film opaque était déposé sur la plaque 384 puits au terme des étapes de marquage. Les plaques étaient ensuite conservées à 4°C jusqu'à leurs lectures.

Les tests d'invasion sur lignée Caco-2/TC-7 étaient similaires aux tests d'invasion sur lignée I-407. L'unique différence se rapportait à l'utilisation du milieu cellulaire DMEM GlutaMAX™ sans antibiotique.

3.3.2. Acquisition des images

Les images ont été acquises à l'aide du microscope automatisé IN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare) avec un objectif Nikon 20x (binning 1X1). Avec ces paramètres et une confluence cellulaire d'environ 70 à 80 %, 2000 à 3 000 cellules par puits ont été imagés par l'acquisition de 9 champs de vision. Les filtres d'excitation et d'émission utilisés pour détecter le DAPI et l'HCS CellMask Blue™ étaient DAPI. Une acquisition au champ large était appliquée pour le canal DAPI. Pour l'Alexa Fluor 488, le filtre d'émission était le FITC. Une acquisition sur le plan confocal était appliquée pour le canal FITC, sur le même champ que le canal DAPI.

3.3.3. Analyse des images et script analytique

Les images ont été analysées à l'aide du logiciel Columbus (PerkinElmere). Ce flux de travail d'analyse d'images permet l'identification des structures cellulaires et subcellulaires à partir de blocs de construction prédéfinis. Un script analytique a été réalisé pour chaque lignée cellulaire testée. La validité des tests d'infection et de l'analyse des images étaient éprouvées sur 112 souches. Les noyaux des cellules étaient colorés au DAPI et les cytoplasmes étaient colorés au HCS Cell Mask Blue. Pour l'identification des noyaux des cellules épithéliales intestinales, nous avons utilisé le canal DAPI et appliqué un algorithme de segmentation nucléaire prédéfini s'appliquant sur la méthode M, le diamètre, le coefficient de division. Ces paramètres permettent l'exclusion des bactéries associées au biofilm. Le cytoplasme cellulaire

était segmenté en s'appuyant sur la méthode A avec un seuil individuel de 0,3. Afin d'éviter des biais d'analyse, la population cellulaire sélectionnée excluait les cellules en bordure. La méthode D était appliquée pour détecter les spots bactériens sur le canal FITC. Les paramètres de la méthode D se basaient sur la sensibilité de détection, le coefficient de vision et la correction de l'arrière-plan. Un ajustement pour la détection des bactéries intracellulaires était réalisé pour la moyenne de l'intensité du spot, excluant l'autofluorescence et les objets dont le contour était diffus. Seules les bactéries situées à l'intérieur des cellules ont été comptées. L'algorithme de segmentation utilisé ici était affiné grâce au réglage de l'intensité de fluorescence des spots FITC pour optimiser l'analyse des images. Lors de la segmentation de tous les objets d'intérêt, des données quantitatives ont été extraites. L'application de l'algorithme permettait le recensement par puits du nombre de cellules, du nombre de bactéries, du nombre de cellules infectées, du pourcentage de cellules infectées, de l'aire bactérienne intracellulaire et de l'aire cellulaire des cellules infectées. D'autres ratios comme le ratio moyen de l'aire bactérienne par rapport à l'aire cellulaire infectée, le rapport de l'aire bactérienne par rapport à l'aire des cellules infectées, le rapport de l'aire bactérienne par rapport à l'aire cellulaire des cellules sélectionnées étaient également disponibles.

3.4. Caractérisation fonctionnelle des AIEC sur modèle *C. elegans*

3.4.1. Bactéries et conditions de culture

Les souches d'*E. coli* testées sur le nématode, comprenaient des souches issues de la collection de référence ECOR et des isolats cliniques. Les souches étaient cultivées dans un milieu Luria-Bertani (LB) à 30°C ou 37°C, sous agitation. La souche OP50 est la souche de contrôle "gold-standard" utilisée dans les essais de survie de *C. elegans* (Brenner, 1974). Parmi les souches testées, MG1655 est une souche prototype d'*E. coli* K-12 non invasive, non pathogène et dérivée du microbiote commensal humain. *E. coli* Nissle 1917 est une souche commensale non invasive et non pathogène, utilisée à ce jour comme un probiotique pour traiter différents troubles gastro-intestinaux. La souche AIEC LF82 a également été évaluée, étant considérée comme la souche de référence associée à la maladie de Crohn (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998). Comme la souche LF82, la souche NRG857c est également une souche prototype d'AIEC présentant des caractéristiques intestinales profibrogènes supplémentaires (Small *et al.*, 2013). Les autres souches utilisées dans la présente étude étaient des isolats

humains non-AIEC ou AIEC provenant de la collection de l'Université de Lille (Lille, France). EC-6029, EC-6089, EC-6097, EC-6100, EC-6259, EC-7033, EC-7074, EC-7090, EC-7101, EC-7103, EC-7033, EC-7107, EC-7113, EC-7137. Tous les patients avaient donné leur consentement écrit et éclairé à l'isolement de souches bactériennes à partir de leurs biopsies ou de leurs selles. La constitution de la collection avait été approuvée par un comité d'examen institutionnel (références : CCPPRB Lille 1994 #94/01 et CCPPRB Lille 2000 #00/60).

3.4.2. *C. elegans*, culture et courbes de survie

Une approche comparative des deux souches de nématodes a été réalisée pour évaluer la survie suite à l'infection des souches sélectionnées. La souche N2 de vers sauvages a été obtenue par le centre *Caenorhabditis* Genetics Center (Minneapolis, MN, Etats-Unis). La souche *C. elegans* PX627 provient également du centre *Caenorhabditis* Genetics Center (donnée gracieusement par Jonathan Ewbank).

Les vers *C. elegans* N2 étaient maintenus en culture à 20°C ou à 25°C sur un milieu gélosé *Nematode Growth Medium* (NGM) incluant la souche *E. coli* OP50 comme source de nourriture. Les expériences étaient répétées trois fois au moins. Pour chaque souche, l'infection était réalisée sur au moins 75 vers avec un nombre limité de 35 vers par boîte. Pour déterminer la durée de vie des vers infectés, des larves au stade L1 étaient synchronisées et cultivées à 20°C pour atteindre le stade de jeune adulte. Afin d'obtenir une population synchrone de vers stériles, le composé 5-fluoro-2'-désoxyuridine (FudR, 50 µM) a été ajouté sur les boîtes de gélose. Les boîtes de gélose ont étéensemencées avec les souches présentées et *E. coli* OP50 comme contrôle. Pour la suite de l'expérience, les vers étaient maintenus à 25°C. L'évaluation de la survie des vers après infection, était réalisée toutes les 24 heures. Un ver était considéré comme mort par absence de réaction suite à un contact d'un fil de platine. Au cours de l'expérience, les vers morts étaient retirés.

Les vers *C. elegans* PX627, à la différence du ver *C. elegans* N2, est une souche d'infertilité inductible par l'auxine pour contrôler la population. Elle a l'avantage de ne pas affecter les fonctions mitochondriales et une durée de vie significativement plus importante comme la souche *C. elegans* N2. L'utilisation de ce ver permet de s'affranchir des biais possibles liés à l'utilisation du composé FudR (Dilberger *et al.*, 2020). Pour isoler les œufs et synchroniser les populations, les adultes gravides étaient blanchis à l'aide d'un agent de blanchiment de laboratoire standard et de NaOH. Après incubation des œufs sur les boîtes NGM pendant une

nuit à 25°C sans *E. coli* OP50, les larves L1 étaient transférées dans d'autres boîtes NGM (1mM d'acide indole 3-acétique)ensemencées avec *E. coli* OP50. Une fois que les larves atteignaient le stade adulte (2 jours d'incubation à 25°C), l'infection était initiée. Pour chaque souche, une culture liquide en milieu Luria-Bertani était réalisée pendant une nuit à 30° C. Le lendemain, 5 boîtes de NGM (35 mm) étaient inoculées avec une goutte de la culture bactérienne. Après diminution de la température des boîtes, les jeunes vers adultes au nombre de 20 par plaque étaient déposés. Pour les essais de survie, les boîtes étaient maintenues à 25°C. L'évaluation du nombre de vers vivants et un retrait des vers morts étaient assurés quotidiennement sur une durée de 2 semaines. Un ver était considéré comme mort par absence de réaction suite à un contact d'un fil de platine. Les essais de survie ont été réalisés au moins deux fois.

3.4.3. Lignées cellulaires et tests d'invasion sur cellules épithéliales intestinales

Pour prédéterminer les souches *E. coli* non invasives des souches invasives, un test d'invasion était réalisé sur la lignée cellulaire intestine-407 (I-407). Comme présenté précédemment, les cellules étaient cultivées à 37°C dans une atmosphère humide enrichie à 5% en CO₂ dans le milieu de culture Basal Medium Eagle (BME) supplémenté de 10% de sérum de veau foetal défibriné (SVF ; Eurobio Scientific, France), 1% de L-glutamine (Thermofisher, Ilkirch, France) et 1% de Pénicilline/Streptomycine (Thermofisher, Ilkirch, France).

Les essais d'invasion étaient identiques à ceux présentés précédemment (Matériels et Méthodes, Section 3.1.3.). Ainsi, les plaques de 24 puits contenaient 4*10⁵ cellules par puits, cultivées dans un milieu BME sans antibiotique. Les cellules étaient infectées par les souches *E. coli* présentées durant 3 heures à une MOI de 10. Après trois rinçages au PBS1X, les cellules étaient traitées à l'antibiotique avec le milieu BME supplémenté à la gentamicine (100 µg/mL) durant 1 heure. Après 3 rinçages au PBS 1X, les cellules étaient lysées par ajout d'1 ml du mélange réactionnel PBS 1X / TritonX100 (0,1%) pour chaque puits. Cinq microlitres de chaque puits étaient ensuite étalés sur milieux gélosés directement (pur) puis après 5 dilutions sériées au 1/10ème. Après une incubation de 24h à 37°C, les colonies issues des suspensions bactériennes initiales (inoculum initial) et des lysats cellulaires (inoculum final) étaient dénombrées. Une souche était considérée invasive lorsque le rapport : (inoculum final / inoculum initial) x100 était ≥ 0,1 %. Les souches AIEC LF82 et Nissle 1917 étaient associées à chaque expérience à titre de témoins positif et négatif respectivement.

3.4.4. Microscopie

Les acquisitions d'images étaient réalisées en microscopie confocale à l'aide du microscope Carl Zeiss LSM présentant 5 lasers (405, 458, 488, 514 et 633 nm). Le protocole d'infection était similaire à celui présenté ci-dessus. Les cellules étaient infectées à MOI 10 suivant le test à la gentamicine à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5 % en CO₂. Au terme des trois heures d'infection et d'une heure de traitement antibiotique à la gentamicine (100 µg/mL) à 37°C, les cellules étaient lavées 3 fois dans du PBS 1X stérile. Ensuite, les cellules étaient fixées à la PFA 4 % à température ambiante durant 20 minutes. Une étape de perméabilisation cellulaire était réalisée durant 5 minutes au PBS 1X/Triton X100 0,1 % (Sigma Chemical Company). Un mélange réactionnel PBS1X et SVF à une dilution au 1 : 10 pendant 30 minutes était ensuite déposé sur les cellules. Une triple coloration était alors réalisée pour mettre en évidence l'invasion bactérienne intracellulaire. Les membranes des cellules étaient colorées en rouge à l'aide d'agglutinine de germe de blé fluorescente (WGA-Alexa 594, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) à une concentration finale de 5 µg/mL et les noyaux colorés en bleu à l'aide de 1 µM de DAPI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, États-Unis). Les bactéries étaient colorées en vert à l'aide d'un anticorps polyclonal primaire de lapin anti-LPS (1 : 5000) et d'un anticorps secondaire de lapin anti-lapin Alexa Fluor-488 conjugué (1 : 5000), (ThermoFisher, Illkirch, France).

3.5. Statistique

3.5.1. Caractérisation phénotypiques et génotypiques des *E. coli*

La différence d'invasion des souches suivant la lignée cellulaire épithéliale était examinée à l'aide d'une analyse de variance non paramétrique à sens unique (test U de Mann-Whitney). L'indice de formation de biofilm (IFB), l'invasion, la survie et la réplication ont été comparés par le test de Chi-2 (seuil de signification statistique : $p < 0,05$). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.5.2. Caractérisation de l'invasivité des souches par HCS

La validation d'une valeur seuil discriminant les souches invasives des souches non invasives suivant les deux lignées cellulaires utilisées a été établie à l'aide du test de Chi-2 (seuil de signification statistique : $p < 0,05$). La performance du test a été évaluée sur les deux

MOI par la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive, la valeur prédictive négative, le rapport de vraisemblance positif et négatif. La méthodologie appliquée était le test Wilson-Brown (seuil de signification statistique : $p < 0,05$). Le risque relatif a été calculé par la méthode Koopman (seuil de signification statistique : $p < 0,05$).

3.5.3. Caractérisation des AIEC à l'aide du nématode *C. elegans*

La différence d'invasion des souches était examinée à l'aide d'une analyse de variance non paramétrique à sens unique (test U de Mann-Whitney). La survie des nématodes a été analysée à l'aide de la méthode Kaplan-Maier ; les différences entre les courbes de survie ont été évaluées à l'aide d'un test du logarithme des rangs (Mantel Cox) et pour les résultats limites du test de Gehan-Breslow-Wilcoxon dans le logiciel Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Les associations entre les variables ont été qualifiées par le coefficient de corrélation de rang de Spearman affecté d'une valeur p, ainsi que par la régression linéaire (Pearson) à l'aide du module complémentaire XLSTAT (Addinsoft, Bordeaux, France) pour Excel® (Microsoft, Inc, Redmond, WA, USA). Le seuil de signification statistique a été fixé à $p < 0,05$ pour toutes les analyses statistiques.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

4.1. Caractérisation phénotypique et génotypique des souches

4.1.1. Invasivité des souches sur lignée cellulaire épithéliale I-407

Afin d'identifier les souches *E. coli* présentant un phénotype AIEC potentiel, nous avons caractérisé le pouvoir invasif de 110 souches d'*E. coli* sur la lignée épithéliale I-407 (*Figures 10 et 11*). Parmi les souches testées, 70 étaient issues de la collection ECOR et 40 souches provenaient d'une collection clinique. A partir du test de protection à la gentamicine, le ratio d'invasion de chaque souche a été évalué sur l'ensemble des souches (n = 110). Les souches résistantes à la gentamicine (ECOR 46 et 7080) et cytotoxiques (n = 10 ; ECOR 6, ECOR 46, ECOR 53, ECOR 54, ECOR 59, ECOR 60, ECOR 61, EC-6023, EC-7076 et EC-7134) étaient exclues de l'analyse statistique. Parmi les souches sélectionnées (n = 101), 34 (34 %) étaient invasives avec un score d'invasion allant de 0,1 % à 0,94 %. 67 souches (66 %) présentaient un score d'invasion allant de 0 % à 0,09 %.

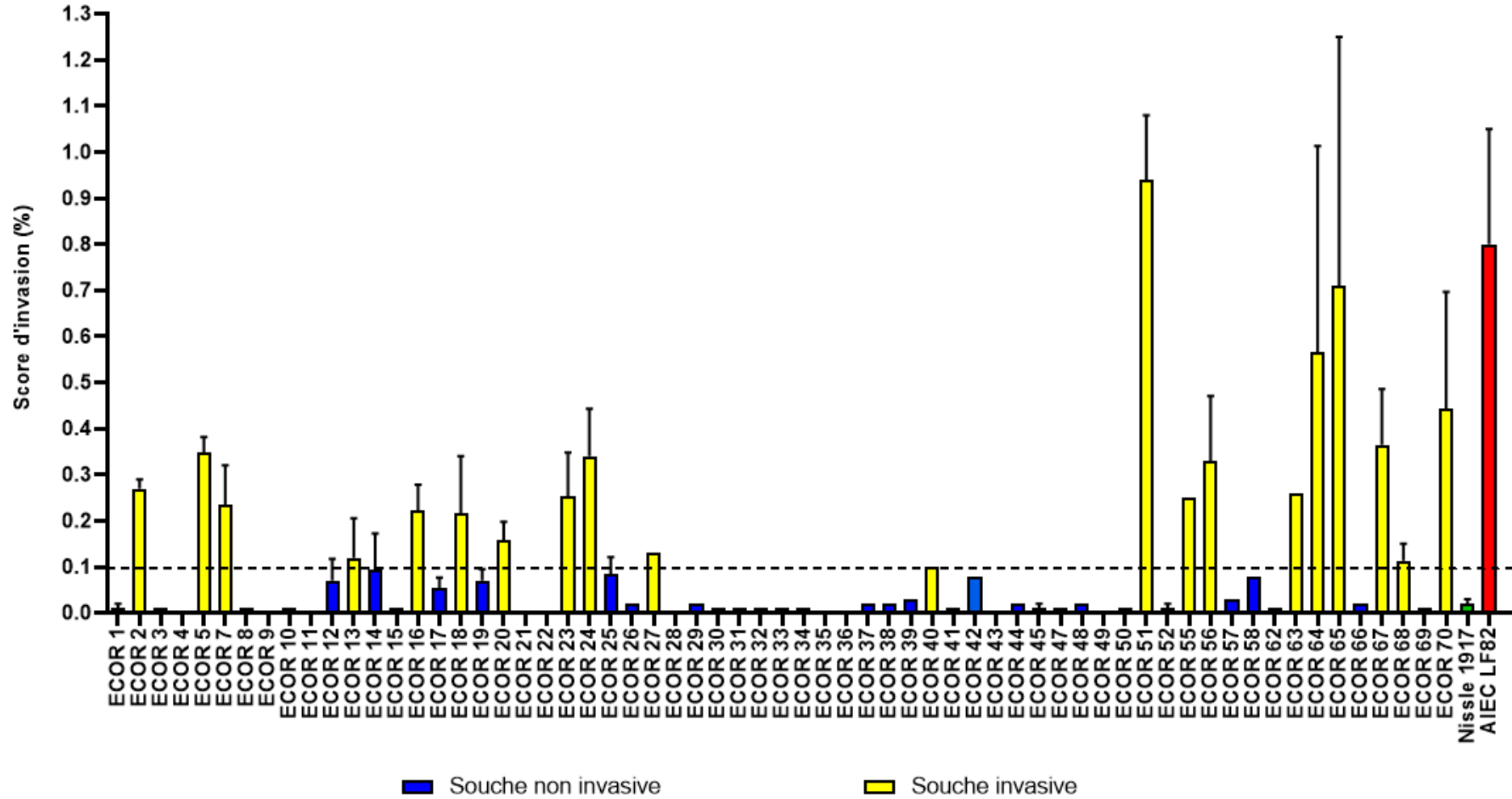


Figure 10. Scores moyens d'invasion des souches *E. coli* issues de la collection ECOR aux cellules I-407 (n = 71 incluant la souche Nissle 1917 comme témoin négatif et la souche LF82 comme témoin positif). La souche ECOR 46 résistante à la gentamicine, a été exclue des tests d'invasion.

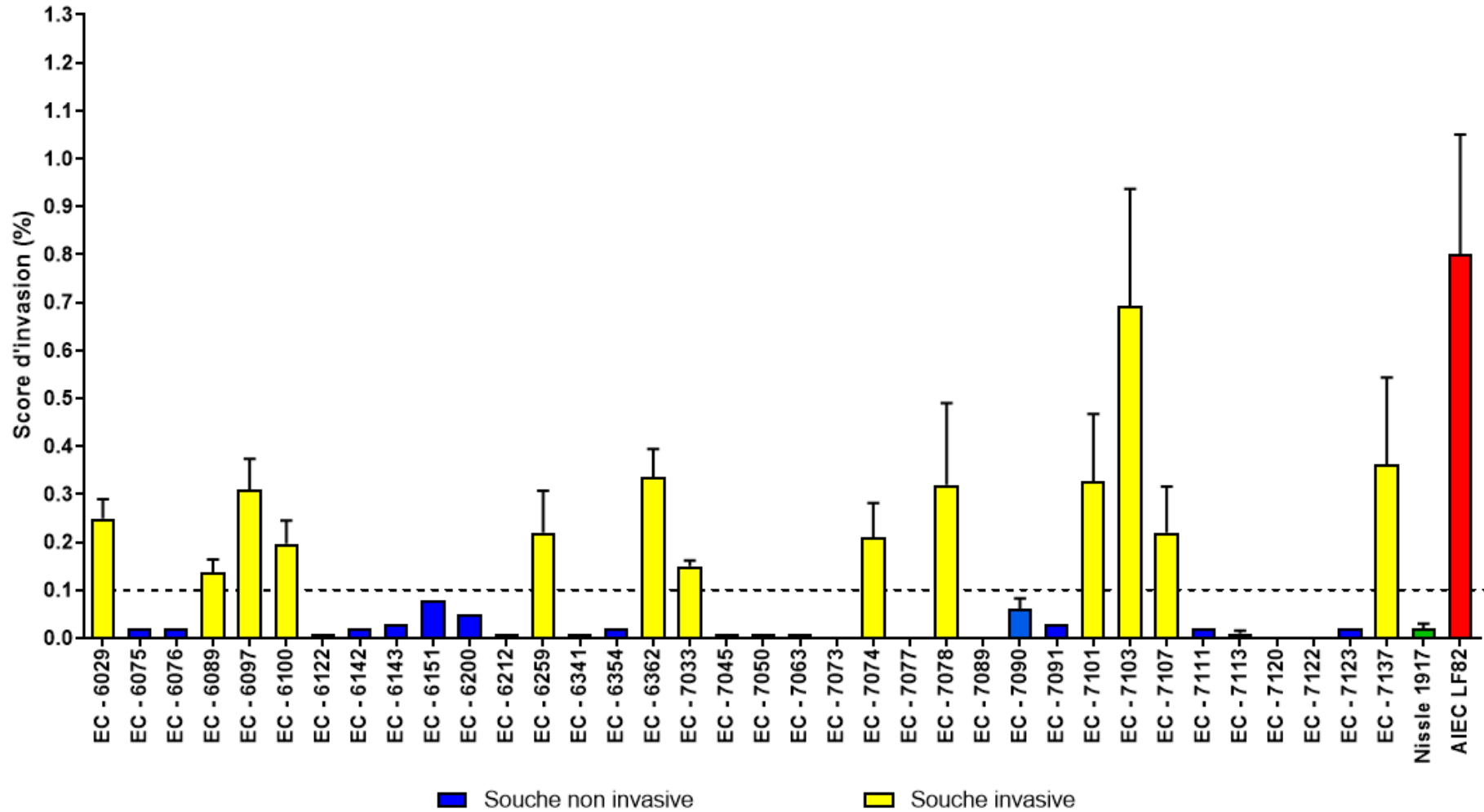


Figure 11. Scores moyens d'invasion des souches *E. coli* issues de la collection clinique aux cellules I-407 (n = 41 incluant la souche Nissle 1917 comme témoin négatif et la souche LF82 comme témoin positif). La souche EC-7080 résistante à la gentamicine, a été exclue des tests d'invasion.

4.1.2. Invasivité des souches sur lignée cellulaire épithéliale Caco-2/TC-7

Pour confronter le pouvoir invasif des souches sur une autre lignée cellulaire épithéliale que la lignée cellulaire épithéliale I-407, la lignée Caco-2/TC-7 a été retenue. A partir du test de protection à la gentamicine, le ratio d'invasion a été évalué sur l'ensemble des souches (n = 110 souches) (*Figures 12 et 13*). Pour l'analyse statistique, les souches identifiées comme cytotoxiques (n=10 ; ECOR 6, ECOR 52, ECOR 53, ECOR 54, ECOR 59, ECOR 60, ECOR 61, EC-6023, EC-7076 et EC-7134) et résistantes à la gentamicine (ECOR 46 et EC-7080) étaient exclues de l'analyse. Sur ce panel de 100 souches, 50 souches (50 %) répondaient au premier critère d'identification des AIEC, avec un score d'invasion allant de 0,1 % à 1,57 %. Les souches non invasives au nombre de 50 (50 %) présentaient un score allant de 0,01 % à 0,09 %.

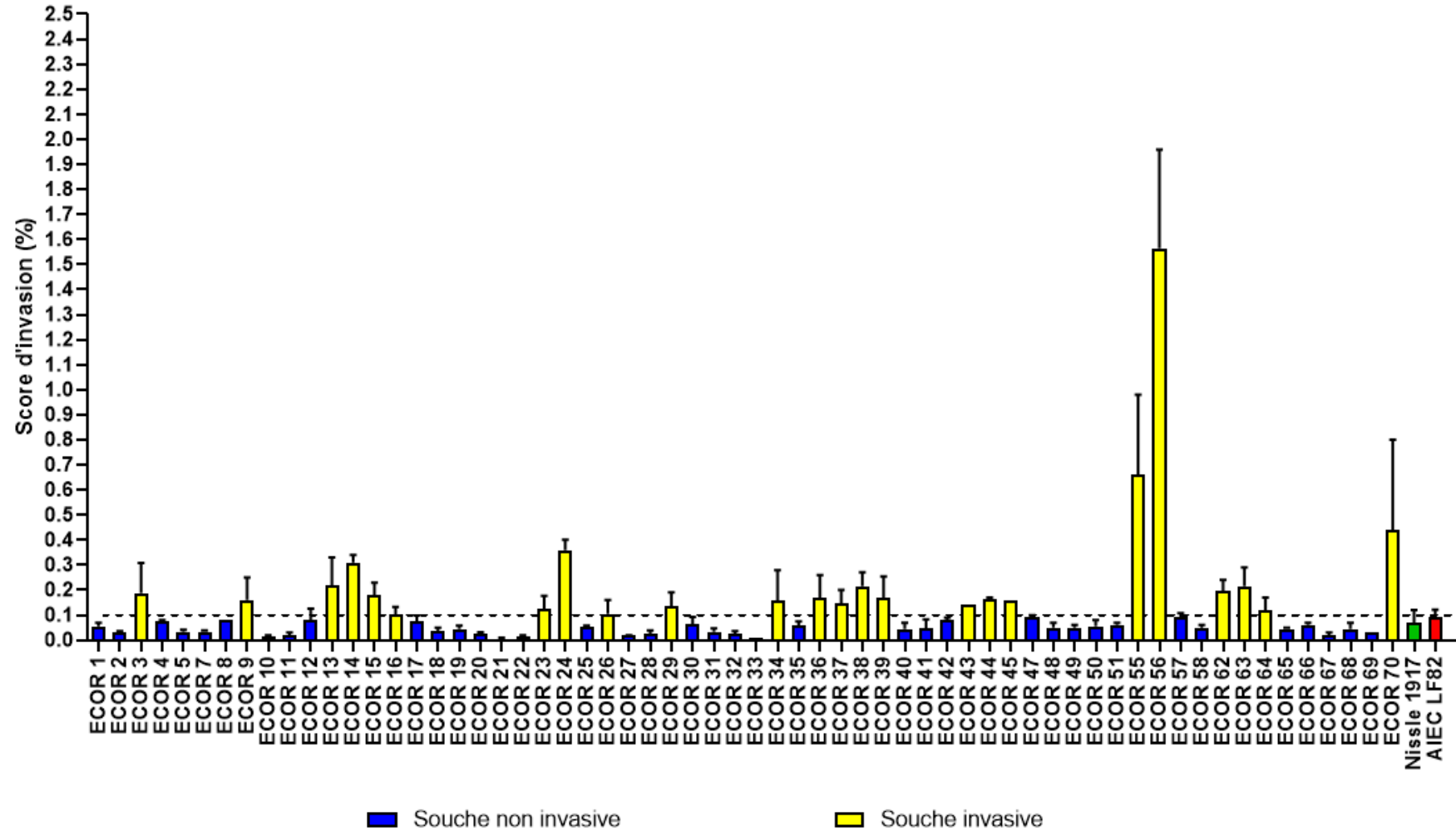


Figure 12. Scores moyens d'invasion des souches *E. coli* issues de la collection ECOL aux cellules Caco-2/TC-7 (n = 71 incluant la souche Nissle 1917 comme témoin négatif et la souche LF82 comme témoin positif). La souche ECOL 46 résistante à la gentamicine, a été exclue des tests d'invasion.

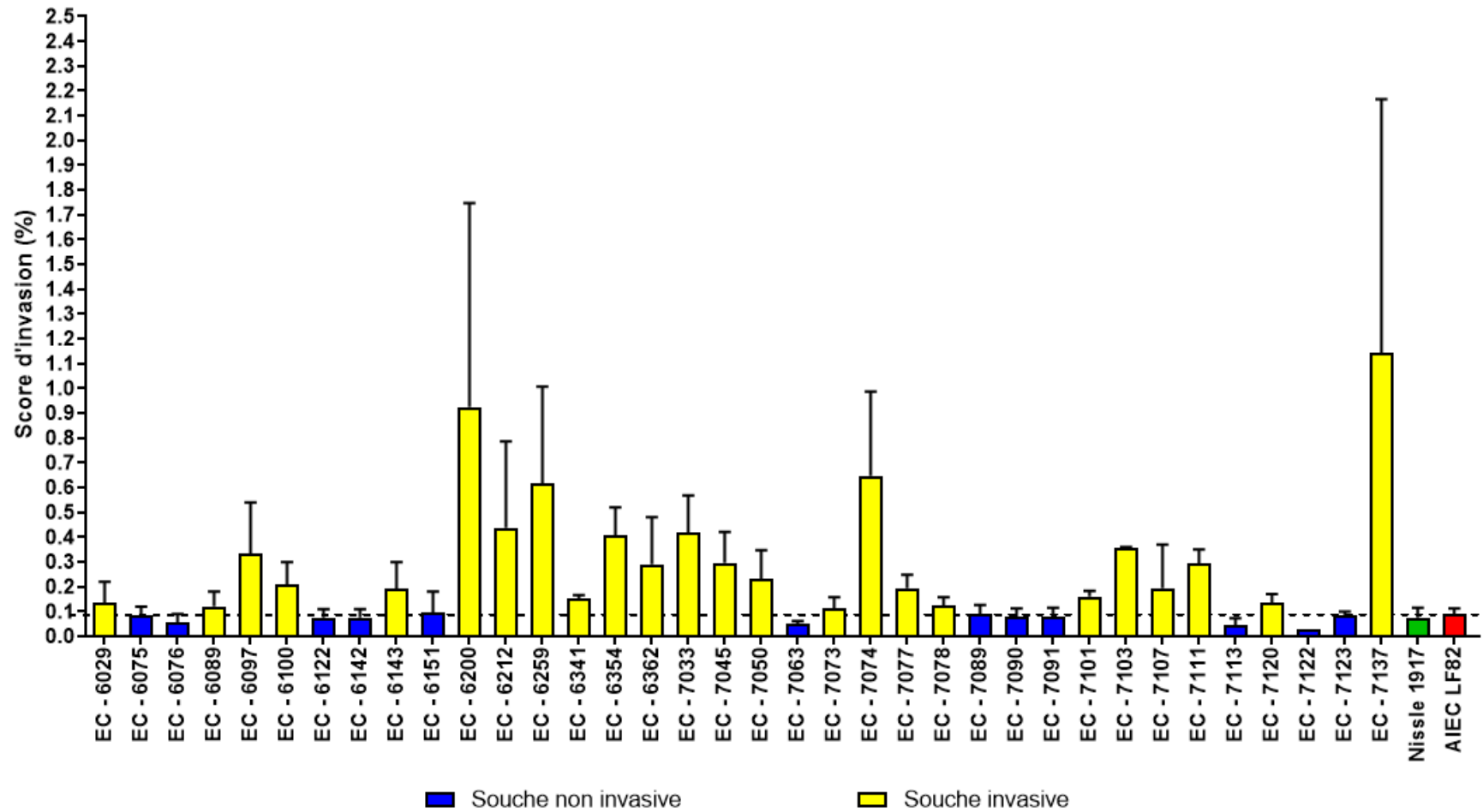
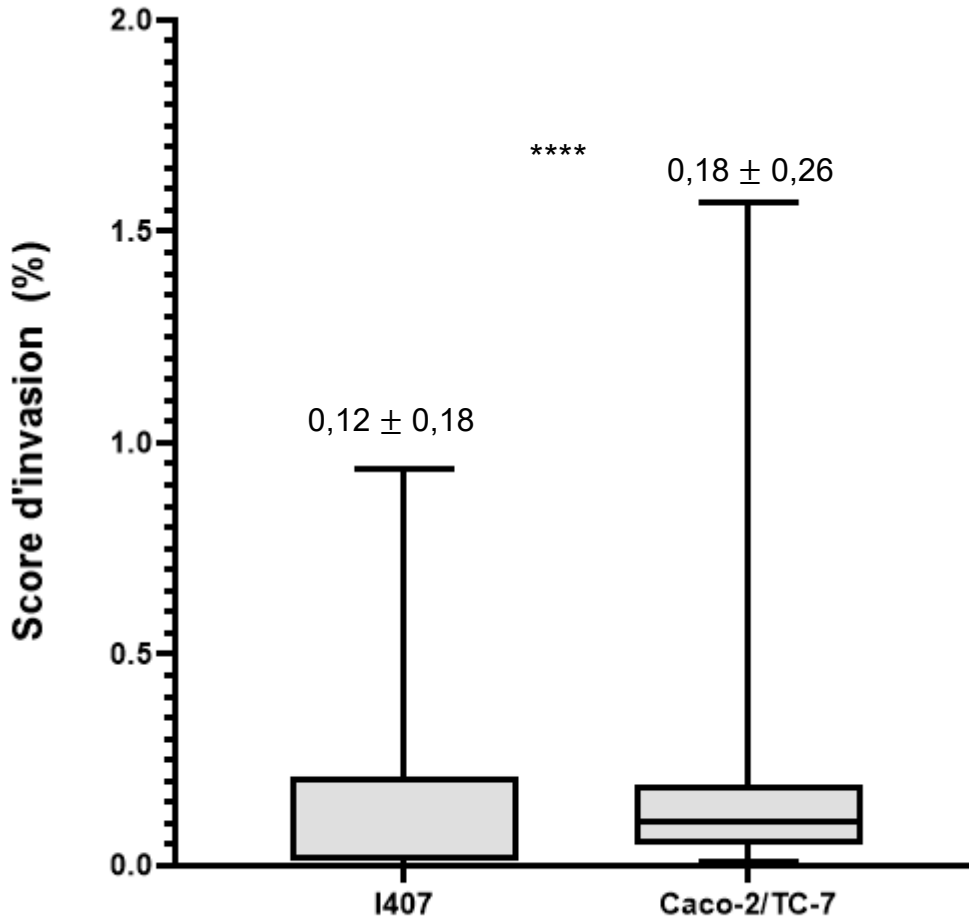


Figure 13. Scores moyens d'invasion des souches *E. coli* issues de la collection clinique aux cellules Caco-2/TC-7 ($n = 41$ incluant la souche Nistle 1917 comme témoin négatif et la souche LF82 comme témoin positif). La souche EC-7080 résistante à la gentamicine, a été exclue des tests d'invasion.

Comme le montre la figure ci-dessous (*Figure 14*), le score d'invasion (SI) moyen était plus élevé pour la lignée épithéliale Caco-2/TC-7 que la lignée épithéliale I-407 ($SI_{\text{Caco-2/TC-7}} = 0,18 \pm 0,26$; $SI_{\text{I-407}} = 0,12 \pm 0,18$, $p < 0,01$).



*Figure 14. Scores moyens d'invasion des souches E. coli issues de la collection ECOR et clinique (n=101) pour la lignée cellulaires I407 et Caco-2/TC-7 (n = 100). Les scores d'invasion des souches étaient plus élevés pour la lignée Caco-2/TC-7 comme démontré par le test non paramétrique Mann-Whitney (***) p-value < 0,001).*

4.1.3. Survie et réplication des souches sur lignée macrophagique J774-A1

Pour poursuivre l'identification des AIEC, la survie a été étudiée sur l'ensemble des souches bactériennes ($n = 110$) sur la lignée macrophagique J774-A1 (*Figures 15 à 18*). Pour l'analyse statistique, les souches résistantes à la gentamicine (EC 7080 et ECOR 46) et cytotoxiques (EC-6200) étaient exclues. Les figures 15 et 16 rapportent les pourcentages d'internalisation des bactéries observés après 1 heure d'infection. L'évaluation de la survie sur 24 heures (figures 17 et 18) a permis de définir 3 profils bactériens : mort bactérienne ($I_REPL < 100 \%$), survie bactérienne ($100 \% \leq I_REPL < 200 \%$) ou réplication bactérienne ($I_REPL \geq 200 \%$) suivant la valeur attribuée à l'index de réplication. L'essai de survie sur macrophages J774-A1 24 heures post-infection a permis d'identifier parmi les souches sélectionnées ($n = 109$), 48 souches incapables de survivre au sein des macrophages J774-A1 24 heures post-infection ($1 \% \leq I_REPL \leq 97 \%$), 27 souches survivantes au sein des macrophages ($113 \% \leq I_REPL \leq 197 \%$) et 34 souches étaient associées à une réplication bactérienne intra-macrophagique ($214 \% \leq I_REPL \leq 613 \%$).

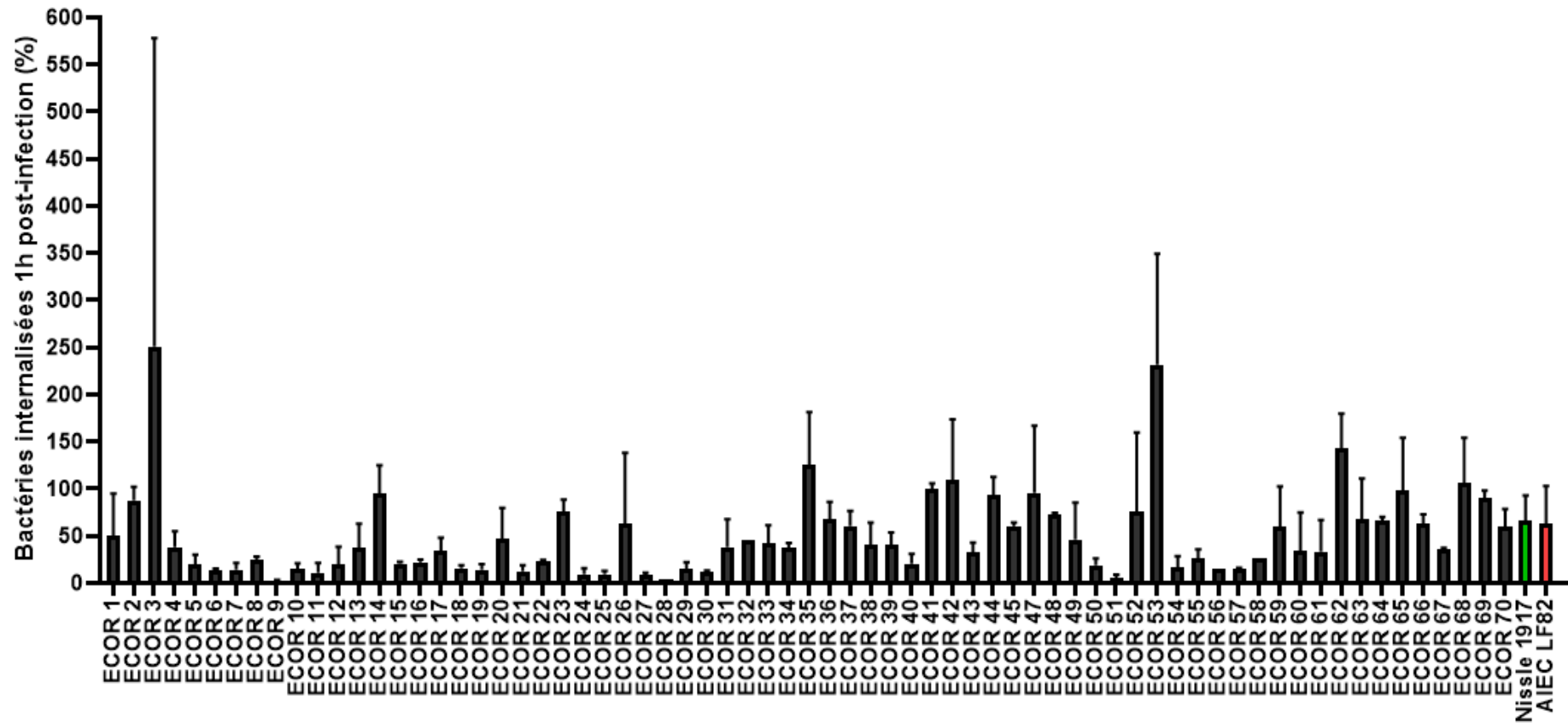


Figure 15. Évaluation du pourcentage de bactéries internalisées par les macrophages J774-A1 des souches *E. coli* issues de la collection ECOR ($n = 71$ incluant la souche probiotique Nissle 1917 et la souche AIEC LF82). Les souches présentant un pourcentage d'internalisation supérieur à 0,1% 1 heure post-infection étaient considérées.

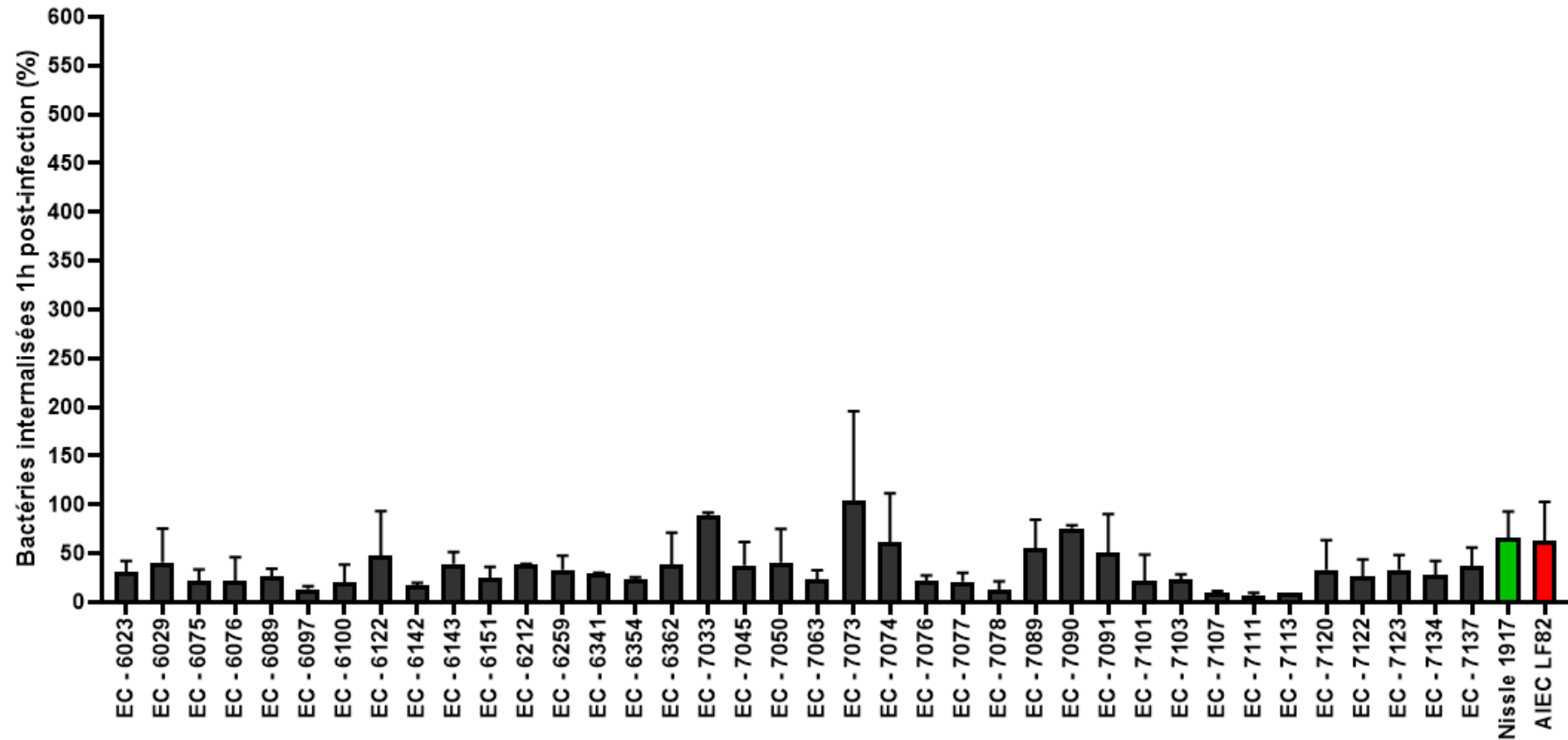


Figure 16. Évaluation du pourcentage de bactéries internalisées par les macrophages J774-A1 des souches *E. coli* issues de la collection clinique ($n = 40$ incluant la souche probiotique Nissle 1917 et la souche AIEC LF82). Les souches présentant un pourcentage d'internalisation supérieur à 0,1% 1 heure post-infection étaient considérées.

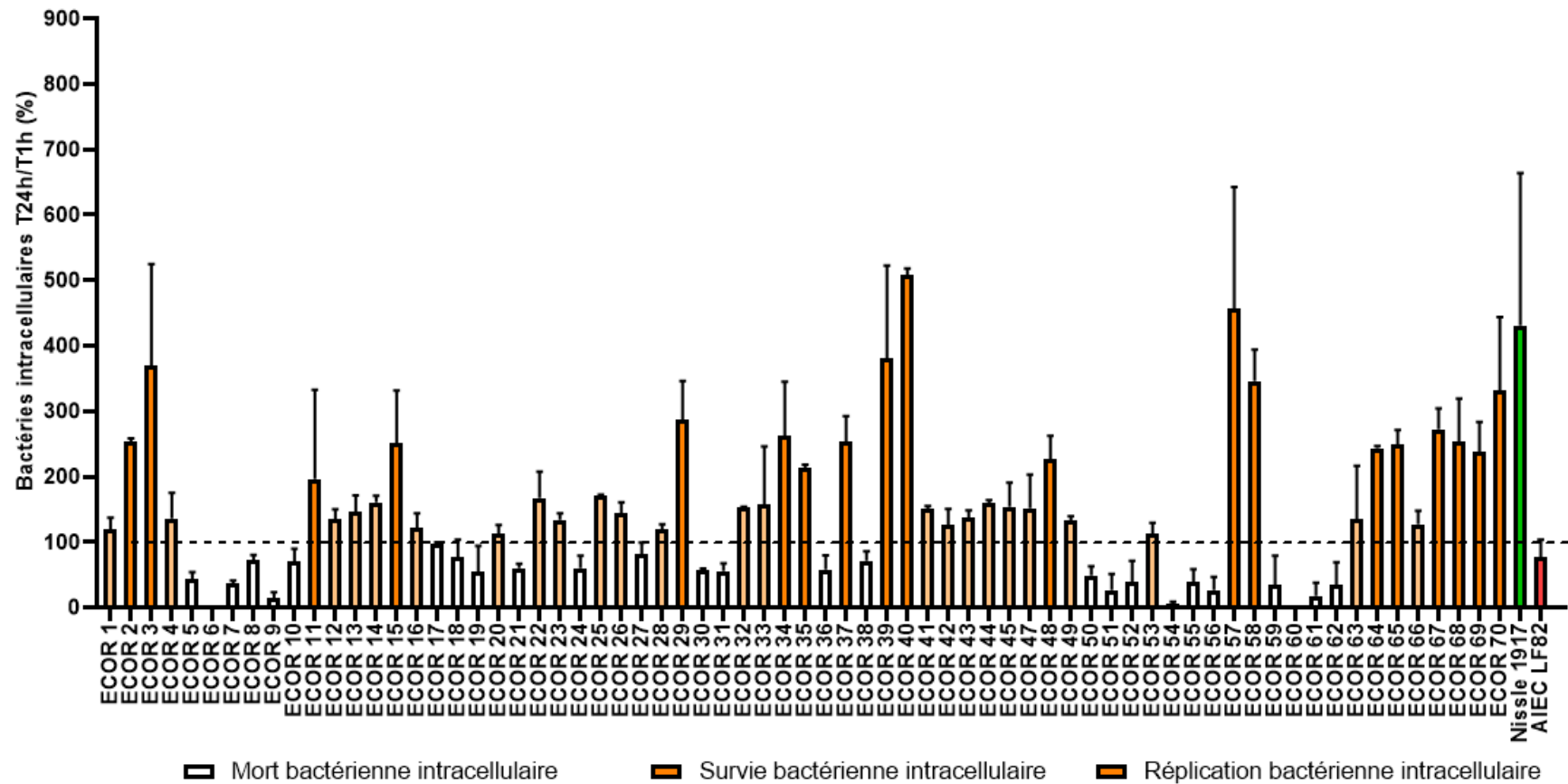


Figure 17. Évaluation du taux de survie à 24 h post-infection des bactéries internalisées 1 heure post-infection par les macrophages J774-A1. Les souches *E. coli* issues de la collection ECOR ($n = 71$ incluant la souche probiotique Nissle 1917 et la souche AIEC LF82) présentant un taux de survie inférieur à 100 % étaient associées à une mort bactérienne. Les souches affichant un taux de survie supérieur ou égal à 100 % démontraient la survie de la souche. Les souches présentant un taux de survie supérieur ou égal à 200% étaient considérées comme capables de se répliquer au sein des macrophages.

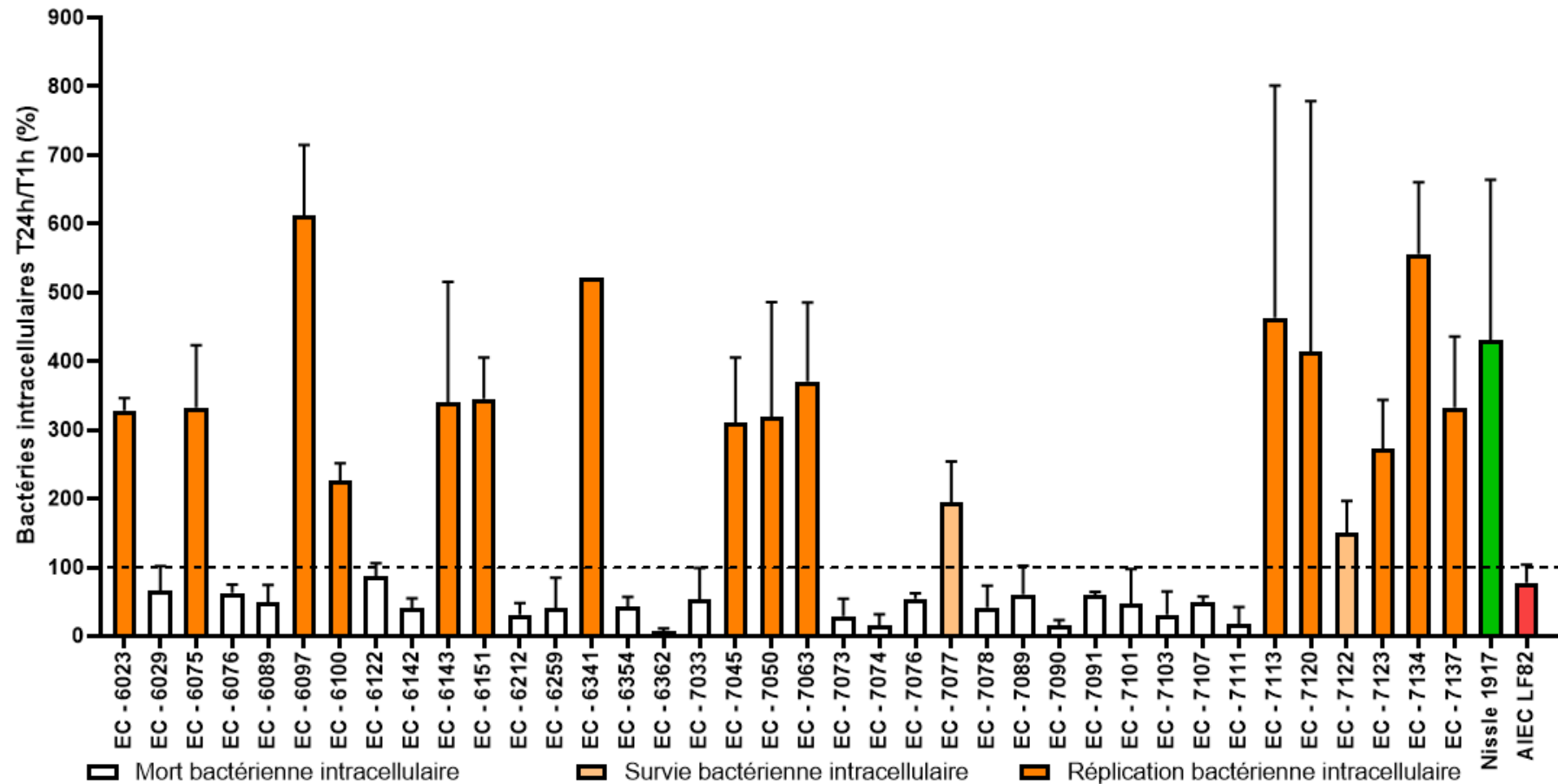


Figure 18. Évaluation du taux de survie à 24 h post-infection des bactéries internalisées 1 heure post-infection par les macrophages J774-A1. Les souches *E. coli* issues de la collection clinique ($n = 40$ incluant la souche probiotique Nissle 1917 et la souche AIEC LF82) présentant un taux de survie inférieur à 100 % étaient associées à une mort bactérienne. Les souches affichant un taux de survie supérieur ou égal à 100 % démontraient la survie de la souche. Les souches présentant un taux de survie supérieur ou égal à 200% étaient considérées comme capables de se répliquer au sein des macrophages.

4.1.4. Caractérisation génotypique des souches

Pour poursuivre l'identification des souches AIEC parmi les collections présentées, la présence de 10 gènes de virulence (*afaD*, *aggR*, *pCVD432*, *eaе*, *exha*, *ipaC*, *bfpA*, *stx1*, *stx2*, *tia*) associés aux pathotypes DAEC, EAEC, EPEC, EHEC, EIEC et ETEC a été recherchée par PCR. Parmi les souches (n = 112), 26 souches présentaient au moins un gène de virulence de type *afaD* (affilié au pathotype DAEC ; n = 9), *eaе* (caractéristique du pathovar EPEC ou EHEC ; n = 2) et *tia* (identifié pour le pathogène ETEC ; n = 22).

Le caractère cytotoxique a également été confirmé par la présence des gènes *hlyA* sur les souches identifiées comme présentant une cytotoxicité partielle lors des tests d'invasion. A ce jour, la cytotoxicité des souches a été confirmée pour les souches ECOR 6, ECOR 51, ECOR 53 et EC-7134.

4.1.5. Identification des AIEC

Au regard des résultats obtenus, les souches *E. coli* reconnues comme AIEC répondaient aux 3 critères phénotypiques de la définition : (i) une invasion supérieure ou égale à 0,1% sur cellules épithéliales intestinales, (ii) une survie bactérienne au sein des macrophages et (iii) une absence de gènes de virulence caractéristiques des *E. coli* entéropathogènes.

Suivant les tests réalisés sur la lignée épithéliale I-407 et Caco-2/TC-7, 29 souches (29 %, n = 99 tenant compte de l'exclusion des souches résistantes à la gentamicine et cytotoxiques) ont été identifiées comme AIEC ([Tableaux 6, 7 et 8](#)). Les souches ECOR 13, ECOR 16, ECOR 23, ECOR 64, EC-6097, EC-6100 et EC-7137 étaient invasives à la fois sur la lignée épithéliale I-407 et Caco-2/TC-7. Sur la lignée I-407, 13 souches répondaient aux 3 critères. Plus précisément, les souches ECOR 2, ECOR 20, ECOR 40, ECOR 65, ECOR 67 et ECOR 68 étaient uniquement invasives sur la lignée épithéliale I-407 ($SI_{INV} = 0,29 \pm 0,18$; min = 0,11 et max = 0,71).

A partir des essais d'invasion sur la lignée épithéliale Caco-2/TC-7, 23 souches répondaient aux 3 critères phénotypiques. Parmi les souches, 16 souches (ECOR 3, ECOR 14, ECOR 15, ECOR 26, ECOR 29, ECOR 39, ECOR 43, ECOR 44, ECOR 45, EC-6143, EC-6151, EC-6341, EC-7045, EC-7050, EC-7077, EC-7120) étaient uniquement invasives sur la lignée épithéliale Caco-2/TC-7 ($SI_{INV} = 0,22 \pm 0,21$; min = 0,10 et max = 1,14).

En termes de survie, les souches AIEC ont été définies comme capables de survivre ou de se répliquer en fonction du taux de survie. L'identification des AIEC a distingué 10 souches (34 %) capables de survivre au sein des macrophages et 19 souches (66 %) capables de se répliquer au sein des macrophages.

Le profil phénotypique et génotypique des *E. coli* incluant les souches cytotoxiques, résistantes à la gentamicine et/ou présentant un gène de virulence communs aux pathovars connus sont représentés dans les tableaux ci-dessous ([Tableaux 9 à 14](#)).

Souches	ECOR 13	ECOR 16	ECOR 23	ECOR 64	EC - 6097	EC - 6100	EC - 7137
Score moyen d'invasion (en %) sur cellules I-407	0,12	0,22	0,25	0,57	0,31	0,20	0,36
Ecart type standard	0,15	0,11	0,16	0,77	0,13	0,08	0,36
Score moyen d'invasion (en %) sur Caco-2/TC-7	0,22	0,10	0,12	0,12	0,34	0,21	1,14
Ecart type standard	0,16	0,06	0,12	0,07	0,29	0,13	1,77
Taux moyen de survie (en %) sur cellules J774-A1	147	122	134	244	613	227	332
Ecart type standard	25	22	10	4	103	25	104
Gènes de virulence	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 6. Profils phénotypiques des 7 souches AIEC invasives sur 2 lignées cellulaires (I-407 et Caco-2/TC-7).

Souches	ECOR 2	ECOR 20	ECOR 40	ECOR 65	ECOR 67	ECOR 68
Score moyen d'invasion (en %) sur cellules I-407	0,27	0,16	0,10	0,71	0,37	0,11
Ecart type standard	0,03	0,08	0,00	0,76	0,24	0,06
Taux moyen de survie (en %) sur cellules J774-A1	253	113	508	249	273	254
Ecart type standard	6	13	11	23	32	65
Gènes de virulence	-	-	-	-	-	-

Tableau 7. Profils phénotypiques des souches AIEC (n = 6 ; invasives sur la lignée cellulaires (I-407) issues de la collection ECOR.

Souches	ECOR 3	ECOR 14	ECOR 15	ECOR 26	ECOR 29	ECOR 39	ECOR 43	ECOR 44	ECOR 45	EC - 6143	EC - 6151	EC - 6341	EC - 7045	EC - 7050	EC - 7077	EC - 7120
Score moyen d'invasion (en %) sur Caco-2/TC-7	0,19	0,31	0,18	0,11	0,14	0,17	0,14	0,17	0,16	0,19	0,10	0,15	0,30	0,23	0,20	0,14
Ecart type standard	0,24	0,04	0,07	0,11	0,08	0,15	0,00	0,01	0,00	0,16	0,12	0,03	0,22	0,20	0,09	0,05
Taux moyen de survie (en %) sur cellules J774-A1	370	161	252	144	287	381	137	160	154	340	346	521	310	319	195	415
Ecart type standard	155	11	80	17	59	141	11	5	37	176	60	0	95	168	59	364
Gènes de virulence	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 8. Profils phénotypiques des souches AIEC (n = 16 ; invasives sur la lignée Caco-2/TC-7) issues de la collection ECOR et clinique.

Souches	ECOR 1	ECOR 2	ECOR 3	ECOR 4	ECOR 5	ECOR 6	ECOR 7	ECOR 8	ECOR 9	ECOR 10	ECOR 11	ECOR 12	ECOR 13	ECOR 14	ECOR 15	ECOR 16	ECOR 17	ECOR 18	ECOR 19
Score moyen d'invasion (en %) sur cellules I-407	0,01	0,27	0,01	0,00	0,35	/	0,24	0,01	0,00	0,01	0,00	0,07	0,12	0,09	0,01	0,22	0,05	0,22	0,07
Ecart type standard	0,01	0,03	0,00	0,00	0,07	/	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,15	0,14	0,00	0,11	0,04	0,21	0,04
Score moyen d'invasion (en %) sur Caco-2/TC-7	0,06	0,03	0,19	0,08	0,03	/	0,03	0,08	0,16	0,02	0,02	0,08	0,22	0,31	0,18	0,10	0,07	0,04	0,05
Ecart type standard	0,02	0,01	0,24	0,01	0,02	/	0,01	0,00	0,13	0,01	0,01	0,09	0,16	0,04	0,07	0,06	0,05	0,02	0,03
Taux moyen de survie (en %) sur cellules J774-A1	119	253	370	136	44	1	37	73	15	70	197	136	147	161	252	122	97	78	55
Ecart type standard	18	6	155	40	11	1	5	7	8	20	136	15	25	11	80	22	3	26	39
Gènes de virulence	-	-	-	-	-	<i>hlyA</i>	-	-	-	-	<i>tia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 9. Profils phénotypiques représentant l'invasivité des souches sur les 2 lignées cellulaires I-407 et Caco-2/TC-7 ainsi que la capacité de survivre au sein des macrophages J774-A1. Les gènes de virulence ont été étudiés à partir de la collection ECOR (ECOR 1 à ECOR 19) incluant la souche cytotoxique ECOR 6.

Souches	ECOR 20	ECOR 21	ECOR 22	ECOR 23	ECOR 24	ECOR 25	ECOR 26	ECOR 27	ECOR 28	ECOR 29	ECOR 30	ECOR 31	ECOR 32	ECOR 33	ECOR 34	ECOR 35	ECOR 36	ECOR 37	ECOR 38
Score moyen d'invasion (en %) sur cellules I-407	0,16	0,00	0,00	0,25	0,34	0,08	0,02	0,13	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,02
Ecart type standard	0,08	0,00	0,00	0,16	0,18	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Score moyen d'invasion (en %) sur Caco-2/TC-7	0,03	0,01	0,02	0,12	0,36	0,05	0,11	0,02	0,03	0,14	0,06	0,03	0,02	0,01	0,16	0,06	0,17	0,15	0,22
Ecart type standard	0,01	0,01	0,01	0,12	0,06	0,01	0,11	0,00	0,02	0,08	0,05	0,03	0,02	0,00	0,21	0,03	0,13	0,08	0,08
Taux moyen de survie (en %) sur cellules J774-A1	113	61	168	134	61	171	144	81	119	287	58	56	153	158	263	214	58	254	72
Ecart type standard	13	6	40	10	19	1	17	18	8	59	2	12	1	88	82	4	22	39	14
Gènes de virulence	-	-	-	-	-	<i>eae</i>	-	-	-	-	-	-	<i>tia</i>	<i>tia</i>	<i>tia</i>	<i>tia</i>	<i>tia</i>	<i>afaD</i>	<i>afaD</i> ; <i>tia</i>

Tableau 10. Profils phénotypiques représentant l'invasivité des souches sur les 2 lignées cellulaires I-407 et Caco-2/TC-7 ainsi que la capacité de survivre au sein des macrophages J774-A1. Les gènes de virulence ont été étudiés à partir de la collection ECOR (ECOR 20 à ECOR 38).

Souches	ECOR 39	ECOR 40	ECOR 41	ECOR 42	ECOR 43	ECOR 44	ECOR 45	ECOR 47	ECOR 48	ECOR 49	ECOR 50	ECOR 51	ECOR 52	ECOR 53	ECOR 54	ECOR 55	ECOR 56	ECOR 57	ECOR 58
Score moyen d'invasion (en %) sur cellules I-407	0,03	0,10	0,01	0,08	0,00	0,02	0,01	0,01	0,02	0,00	0,01	0,94	0,01	/	/	0,25	0,33	0,03	0,08
Ecart type standard	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,01	/	/	0,00	0,20	0,00	0,00
Score moyen d'invasion (en %) sur Caco-2/TC-7	0,17	0,05	0,05	0,08	0,14	0,17	0,16	0,09	0,05	0,05	0,06	0,06	/	/	/	0,66	1,57	0,09	0,05
Ecart type standard	0,15	0,04	0,06	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,03	0,01	0,04	0,01	/	/	/	0,45	0,56	0,03	0,01
Taux moyen de survie (en %) sur cellules J774-A1	381	508	151	127	137	160	154	152	226	134	50	27	39	114	6	39	27	456	346
Ecart type standard	141	11	4	24	11	5	37	51	37	6	13	25	33	16	3	20	20	187	48
Gènes de virulence	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>afaD</i> ; <i>tia</i>	<i>afaD</i> ; <i>tia</i>	<i>afaD</i> ; <i>hlyA</i>	-	<i>hlyA</i>	-	-	-	<i>afaD</i> ; <i>tia</i>	<i>afaD</i> ; <i>tia</i>

Tableau 11. Profils phénotypiques représentant l'invasivité des souches sur les 2 lignées cellulaires I-407 et Caco-2/TC-7 ainsi que la capacité de survivre au sein des macrophages J774-A1. Les gènes de virulence ont été étudiés à partir de la collection ECOR (ECOR 39 à ECOR 58) incluant les souches cytotoxiques ECOR 52, ECOR 53 et ECOR 54.

Souches	ECOR 59	ECOR 60	ECOR 61	ECOR 62	ECOR 63	ECOR 64	ECOR 65	ECOR 66	ECOR 67	ECOR 68	ECOR 69	ECOR 70	EC - 6023	EC - 6029	EC - 6075	EC - 6076	EC - 6089	EC - 6097	EC - 6100
Score moyen d'invasion (en %) sur cellules I-407	/	/	/	0,01	0,26	0,57	0,71	0,02	0,37	0,11	0,01	0,44	/	0,25	0,02	0,02	0,14	0,31	0,20
Ecart type standard	/	/	/	0,00	0,00	0,77	0,76	0,00	0,24	0,06	0,00	0,44	/	0,06	0,00	0,00	0,05	0,13	0,08
Score moyen d'invasion (en %) sur Caco-2/TC-7	/	/	/	0,20	0,22	0,12	0,05	0,06	0,02	0,05	0,03	0,44	/	0,14	0,08	0,06	0,12	0,34	0,21
Ecart type standard	/	/	/	0,06	0,11	0,07	0,01	0,01	0,01	0,04	0,00	0,51	/	0,12	0,07	0,05	0,08	0,29	0,13
Taux moyen de survie (en %) sur cellules J774-A1	35	3	18	35	135	244	249	128	273	254	238	332	329	67	333	63	50	613	227
Ecart type standard	45	0	21	34	82	4	23	21	32	65	46	112	18	35	91	12	25	103	25
Gènes de virulence	-	-	<i>tia</i>	<i>tia</i>	<i>afaD</i> ; <i>tia</i>	-	-	-	-	-	-	<i>afaD</i> ; <i>tia</i>	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 12. Profils phénotypiques représentant l'invasivité des souches sur les 2 lignées cellulaires I-407 et Caco-2/TC-7 ainsi que la capacité de survivre au sein des macrophages J774-A1. Les gènes de virulence ont été étudiés à partir de la collection ECOR (ECOR 59 à ECOR 70) et clinique (EC-6023 à EC-6100) incluant les souches cytotoxiques ECOR 59, ECOR 60, ECOR 61 et EC-6023.

Souches	EC - 6122	EC - 6142	EC - 6143	EC - 6151	EC - 6200	EC - 6212	EC - 6259	EC - 6341	EC - 6354	EC - 6362	EC - 7033	EC - 7045	EC - 7050	EC - 7063	EC - 7073	EC - 7074	EC - 7076	EC - 7077	EC - 7078
Score moyen d'invasion (en %) sur cellules I-407	0,01	0,02	0,03	0,08	0,05	0,01	0,22	0,01	0,02	0,34	0,15	0,01	0,01	0,01	0,00	0,21	/	0,00	0,32
Ecart type standard	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,10	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	/	0,00	0,24
Score moyen d'invasion (en %) sur Caco-2/TC-7	0,08	0,08	0,19	0,10	0,93	0,44	0,62	0,15	0,41	0,29	0,42	0,30	0,23	0,05	0,11	0,65	/	0,20	0,12
Ecart type standard	0,05	0,05	0,16	0,12	1,43	0,60	0,67	0,03	0,19	0,33	0,26	0,22	0,20	0,02	0,08	0,59	/	0,09	0,06
Taux moyen de survie (en %) sur cellules J774-A1	87	41	340	346	/	31	41	521	44	7	54	310	319	371	29	16	55	195	42
Ecart type standard	19	14	176	60	/	17	44	0	13	5	45	95	168	115	25	16	8	59	32
Gènes de virulence	-	-	-	-	-	<i>tia</i>	-	-	-	<i>eae</i>	-	-	-	-	-	<i>tia</i>	<i>tia</i>	-	<i>tia</i>

Tableau 13. Profils phénotypiques représentant l'invasivité des souches sur les 2 lignées cellulaires I-407 et Caco-2/TC-7 ainsi que la capacité de survivre au sein des macrophages J774-A1. Les gènes de virulence ont été étudiés à partir de la collection clinique (EC-6122 à EC-7078) incluant les souches cytotoxiques EC-6200 et EC-7076.

Souches	EC - 7089	EC - 7090	EC - 7091	EC - 7101	EC - 7103	EC - 7107	EC - 7111	EC - 7113	EC - 7120	EC - 7122	EC - 7123	EC - 7134	EC - 7137	Nissle 1917	AIEC LF82
Score moyen d'invasion (en %) sur cellules I-407	0,00	0,06	0,03	0,33	0,69	0,22	0,02	0,01	0,00	0,00	0,02	/	0,36	0,02	0,80
Ecart type standard	0,00	0,04	0,00	0,28	0,49	0,17	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	/	0,36	0,01	0,35
Score moyen d'invasion (en %) sur Caco-2/TC-7	0,09	0,08	0,08	0,16	0,36	0,20	0,30	0,04	0,14	0,03	0,09	/	1,14	0,08	0,09
Ecart type standard	0,08	0,07	0,07	0,04	0,01	0,25	0,08	0,05	0,05	0,00	0,02	/	1,77	0,09	0,05
Taux moyen de survie (en %) sur cellules J774-A1	61	15	60	48	32	49	18	463	415	151	273	556	332	431	78
Ecart type standard	42	8	5	50	33	9	25	338	364	46	71	105	104	233	26
Gènes de virulence	<i>tia</i>	<i>tia</i>	<i>tia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>hlya</i>	-	-	-

Tableau 14. Profils phénotypiques représentant l'invasivité des souches sur les 2 lignées cellulaires I-407 et Caco-2/TC-7 ainsi que la capacité de survivre au sein des macrophages J774-A1. Les gènes de virulence ont été étudiés à partir de la collection clinique (EC-7089 à EC-7137) incluant les souches cytotoxiques EC-7134, la souche probiotique Nissle 1917 et AIEC LF82.

4.2. Biofilm, invasion et survie des souches

4.2.1. Caractérisation de la capacité des souches à former du biofilm sur 48 heures

La capacité de formation de biofilm a été évaluée sur l'ensemble des souches ($n = 112$). La production de biofilm était considérée comme faible si $IFB < 0,16$, modérée si $0,16 \leq IFB < 0,33$ et élevée si $IFB \geq 0,33$. Suivant les souches, la production de biofilm variait de 0,1 à 1,12 avec une moyenne de production de biofilm de 0,30 (*Figures 19 et 20*). Basée sur les critères d'identification de l'IFB, 27 souches (14 ECOR et 13 souches cliniques) présentaient un phénotype producteur de biofilm faible, 53 souches (30 ECOR et 23 souches cliniques) présentaient un phénotype producteur de biofilm modéré et 32 souches (26 ECOR et 6 souches cliniques) étaient fortement productrices de biofilm. La souche AIEC LF82 était considérée comme une souche modérément productrice de biofilm tout comme la souche probiotique Nissle 1917.

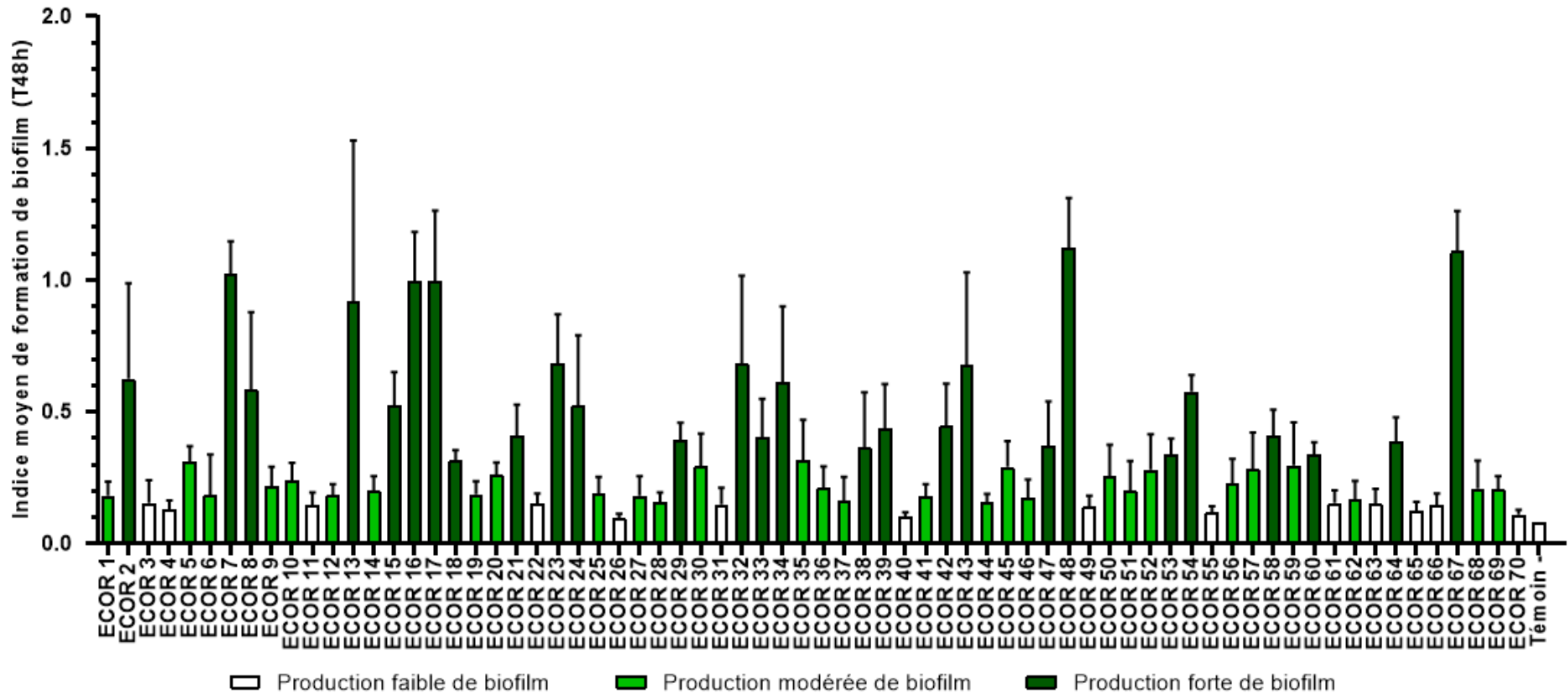


Figure 19. Évaluation de l'indice moyen de formation de biofilm des souches E. coli issues de la collection ECOR (n = 70). Les souches présentant un indice moyen inférieur à 0,16 étaient associées à une faible production de biofilm. Les clones associés à un indice moyen de formation de biofilm strictement supérieur à 0,16 et inférieur ou égal à 0,33 étaient affiliés à une production modérée de biofilm. Les souches présentant un indice moyen de formation de biofilm strictement supérieur à 0,33 étaient associées à une forte production de biofilm.

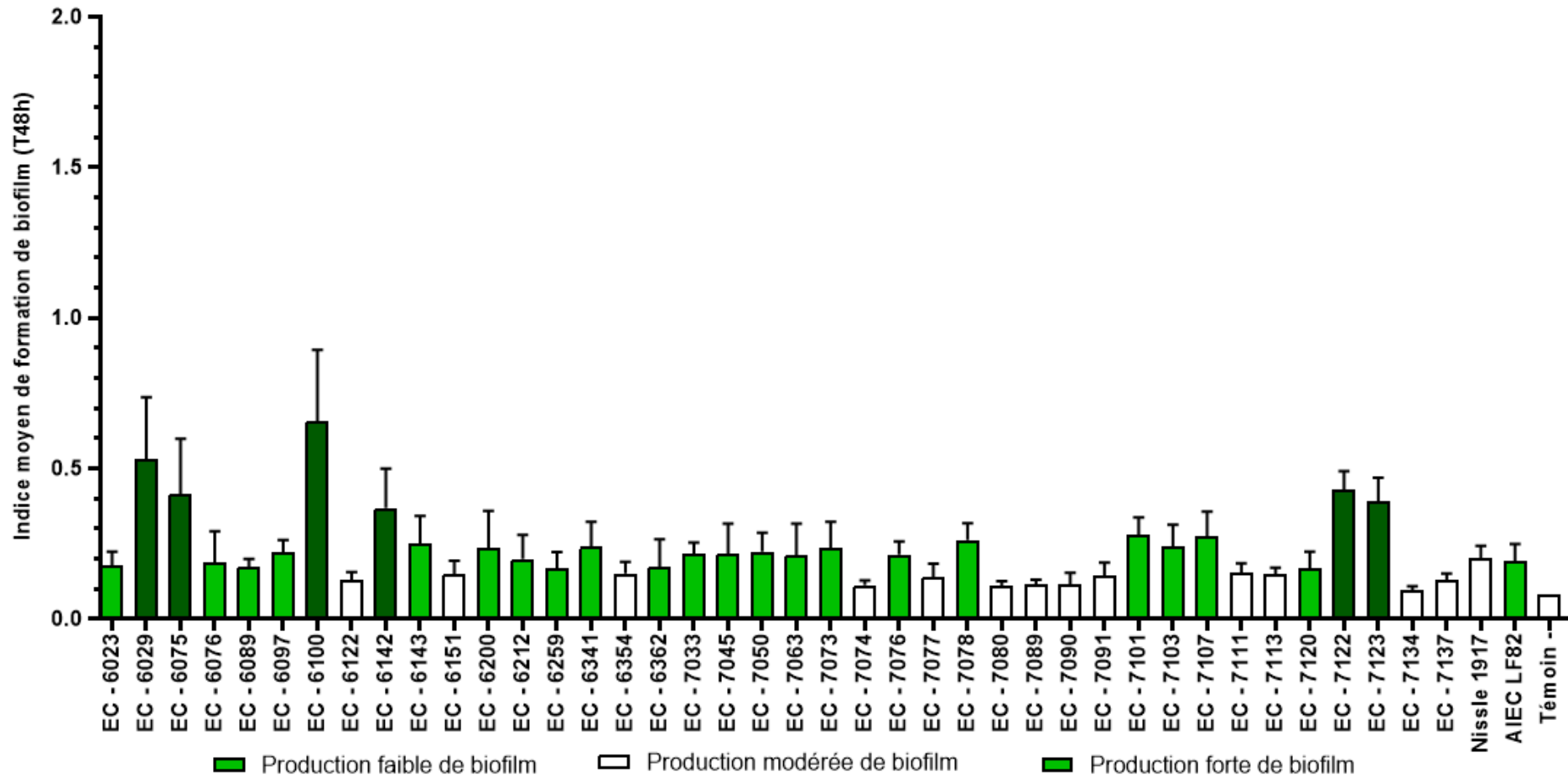


Figure 20. Évaluation de l'indice moyen de formation de biofilm des souches *E. coli* issues de la collection clinique, de la souche Nissle 1917 et la souche AIEC LF82 ($n = 42$). Les souches présentant un indice moyen inférieur à 0,16 étaient associées à une faible production de biofilm. Les clones associés à un indice moyen de formation de biofilm strictement supérieur à 0,16 et inférieur ou égal à 0,33 étaient affiliés à une production modérée de biofilm. Les souches présentant un indice moyen de formation de biofilm strictement supérieur à 0,33 étaient associées à une forte production de biofilm.

4.2.1.1. Biofilm et invasivité des souches

En nous basant sur ces données, la corrélation entre le pouvoir invasif des souches et leur capacité à former du biofilm a été évaluée. Comme précédemment, les souches présentant une résistance à la gentamicine et/ou un phénotype cytotoxique ont été exclues de l'analyse. Parmi les souches identifiées comme invasives sur la lignée épithéliale I-407 (n = 34), 7 souches étaient affiliées au phénotype « producteur de biofilm faible », 17 souches étaient affiliées au phénotype « producteur de biofilm modéré », 10 souches présentaient une capacité de production de biofilm forte ([Tableau 15](#)). Parmi les souches identifiées comme non invasives sur la lignée épithéliale I-407 (n = 67), 17 souches étaient définies comme des souches productrices de biofilm faible, 31 souches comme productrices de biofilm modérée et 19 souches comme des souches fortement productrices de biofilm ([Tableau 15](#)). L'indice IFB moyen des souches invasives sur I-407 était plus élevée que l'indice IFB moyen des souches non invasives sur I-407 ($IFB_{Inv} = 0,36 \pm 0,29$; $IFB_{N-inv} = 0,29 \pm 0,20$; $p\text{-value} = 0,46$).

A partir des souches identifiées comme non invasives sur lignée épithéliale Caco-2/TC-7 (n = 50), 13 souches étaient affiliées au phénotype « producteur de biofilm faible », 21 souches étaient associées au phénotype « producteur de biofilm modéré » et 16 souches présentaient une capacité de production de biofilm forte ([Tableau 15](#)). Parmi les souches invasives sur lignée Caco-2/TC-7, 11 souches étaient affiliées au phénotype « producteur de biofilm faible », 26 souches étaient affiliées au phénotype « producteur de biofilm modéré », 13 souches présentaient une capacité de production de biofilm forte ([Tableau 15](#)). L'indice IFB moyen des souches non invasives sur Caco-2/TC-7 n'était pas significativement plus élevée que l'indice IFB moyen des souches invasives sur Caco-2/TC-7 ($IFB_{Inv} = 0,30 \pm 0,21$; $IFB_{N-inv} = 0,33 \pm 0,29$; $p\text{-value} = 0,80$).

Phénotype bactérien	Lignée cellulaire I-407		Lignée cellulaire Caco-2/TC-7	
	SI < 0,1 % (n = 67)	SI ≥ 0,1 % (n = 34)	SI < 0,1 % (n = 50)	SI ≥ 0,1 % (n = 50)
Production de biofilm faible (IFB < 0,16)	17	7	13	11
Production de biofilm modérée (0,16 ≤ IFB < 0,33)	31	17	21	26
Production de biofilm forte (IFB ≥ 0,33)	19	10	16	13

Tableau 15. Évaluation de la corrélation entre l'invasion des souches et la production de biofilm des souches *E. coli* issues de la collection ECOR et clinique ($n = 101$ pour la lignée I-407 ; $n = 100$ pour la lignée Caco-2/TC-7). Aucune corrélation n'a été démontrée par le test Chi-2 (p -value = 0,86).

4.2.1.2. Biofilm et survie des souches

Comme précédemment, l'existence d'une corrélation entre la capacité ou non de former du biofilm à une survie bactérienne intracellulaire a été étudiée. Parmi les souches identifiées comme capables de survivre au sein des macrophages J774-A1 ($n=61$), 17 souches étaient affiliées au phénotype « producteur de biofilm faible », 22 souches étaient affiliées au phénotype « producteur de biofilm modéré », 22 souches présentaient une capacité de production de biofilm forte (Tableau 16). Parmi les souches associées à une mort bactérienne sur la lignée J774-A1 ($n = 48$), 10 souches étaient définies comme des souches productrices de biofilm faible, 27 souches comme productrices de biofilm modéré et 11 souches comme des souches fortement productrices de biofilm (Tableau 16). L'indice IFB moyen des souches capables de survivre était plus élevée que l'indice IFB moyen des souches non invasives sur I-407 ($IFB_{Sur} = 0,33 \pm 0,25$; $IFB_{N-sur} = 0,28 \pm 0,19$; p -value = 0,71).

Lignée cellulaire J774-A1			
Phénotype bactérien	I_REPL < 100 % (n = 48)	100 % ≤ I_REPL < 200 % (n = 27)	I_REPL ≥ 200 % (n = 34)
Production de biofilm faible (IFB < 0,16)	10	8	8
Production de biofilm modérée (0,16 ≤ IFB < 0,33)	27	9	14
Production de biofilm forte (IFB ≥ 0,33)	11	10	12

Tableau 16. Évaluation de la corrélation entre la survie, la réplication et la mort bactérienne des souches et la production de biofilm des souches E. coli issues de la collection ECOR et clinique (n = 109). Aucune corrélation n'a été démontrée par le test de Chi-2 (p-value = 0,36).

4.2.1.3. Corrélation entre le biofilm, l'invasion et la survie des souches ?

A partir des données phénotypiques obtenues des souches, l'existence d'une corrélation par test de Chi-2 a été évaluée sur différents caractères. Les paramètres étudiés ainsi que la valeur du *p-value* sont représentés dans le tableau ci-dessous ([Tableau 17](#)).

	Production de biofilm /Absence de biofilm (T48h)	Production faible / modérée / forte de biofilm (T48h)
Invasion / Absence d'invasion sur cellules I-407	0,59	0,86
Invasion / Absence d'invasion sur cellules Caco-2/TC-7	0,21	0,60
Mort / Survie bactérienne	0,51	0,14
Mort / Survie / Réplication bactérienne	0,36	0,32

Tableau 17. Évaluation d'une existence de corrélation entre le biofilm (absence, présence, niveaux) et l'invasivité (lignées cellulaires I-407 et Caco-2/TC-7) ou la survie bactérienne (mort, survie, réplication bactérienne). Les valeurs représentées sont les p-value obtenues à partir du test de Chi-2.

Comme démontré précédemment, le biofilm ni la catégorisation des biofilms ne peuvent être corrélées à l'invasivité des souches sur les différentes lignées cellulaires étudiées ni à la survie ou réplication bactérienne.

4.2.2. Caractérisation de la capacité des souches à former du biofilm sur 3 heures

La production de biofilm sur un délai de 3 heures a également été étudiée sur l'ensemble des souches ($n = 112$). La production de biofilm était considérée comme faible si $IFB < 0,14$, modérée si $0,14 \leq IFB < 0,28$ et élevée si $IFB \geq 0,28$. Suivant les souches, la production de biofilm variait de 0,07 à 0,6 avec une moyenne de production de biofilm de 0,13. En nous basant sur les critères d'identification de l'IFB, 87 souches (48 souches ECOR et 37 souches cliniques, la souche AIEC LF82 et Nissle 1917) présentaient un phénotype « producteur de biofilm faible », 18 souches (16 ECOR et 2 souches cliniques) présentaient un phénotype « producteur de biofilm modéré » et 7 souches (6 souches ECOR et 1 souches clinique) étaient fortement productrices de biofilm (*Figures 21 et 22*).

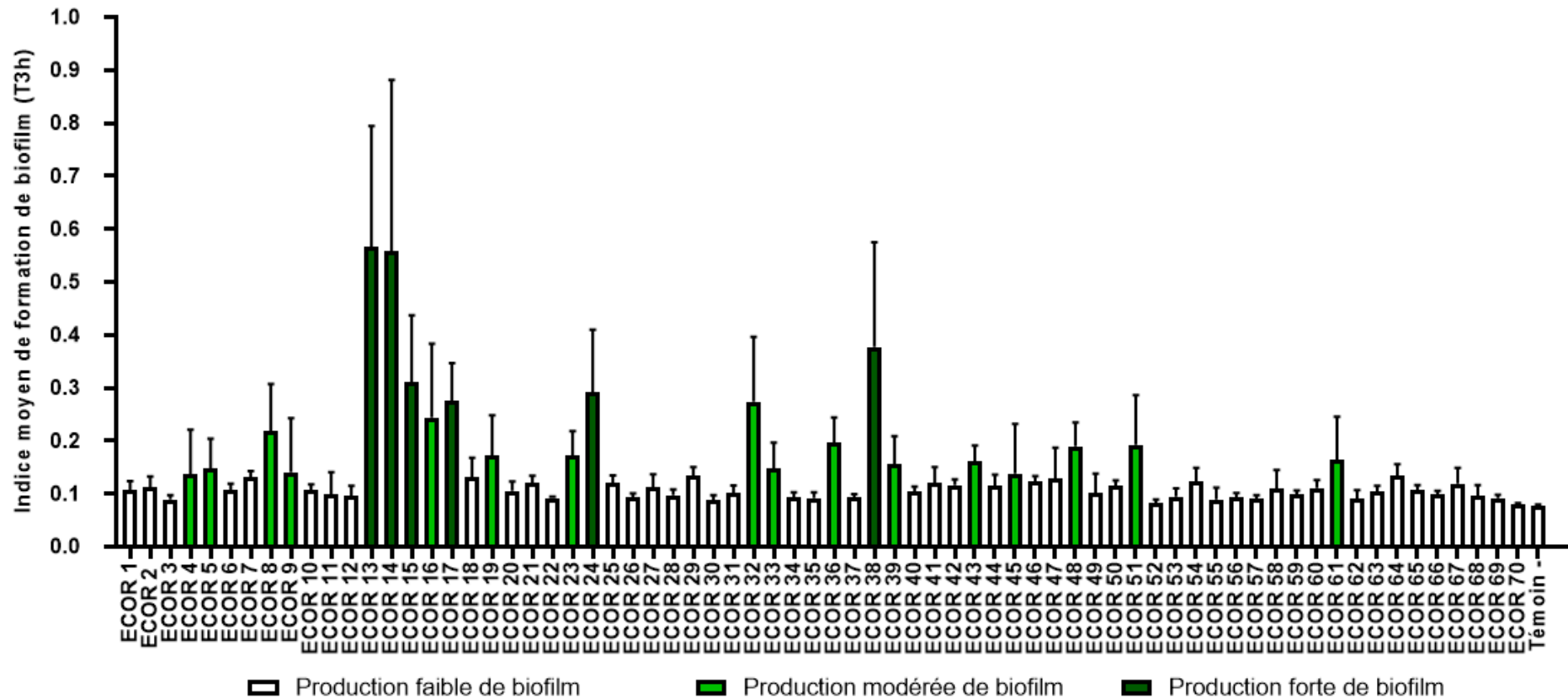


Figure 21. Evaluation de l'indice moyen de formation de biofilm des souches *E. coli* issues de la collection ECOR ($n = 70$). Les souches présentant un indice moyen inférieur à 0,14 étaient associées à une faible production de biofilm. Les clones associés à un indice moyen de formation de biofilm strictement supérieur à 0,14 et strictement inférieur à 0,28 étaient affiliés à une production modérée de biofilm. Les souches présentant un indice moyen de formation de biofilm supérieur ou égal étaient associées à une forte production de biofilm.

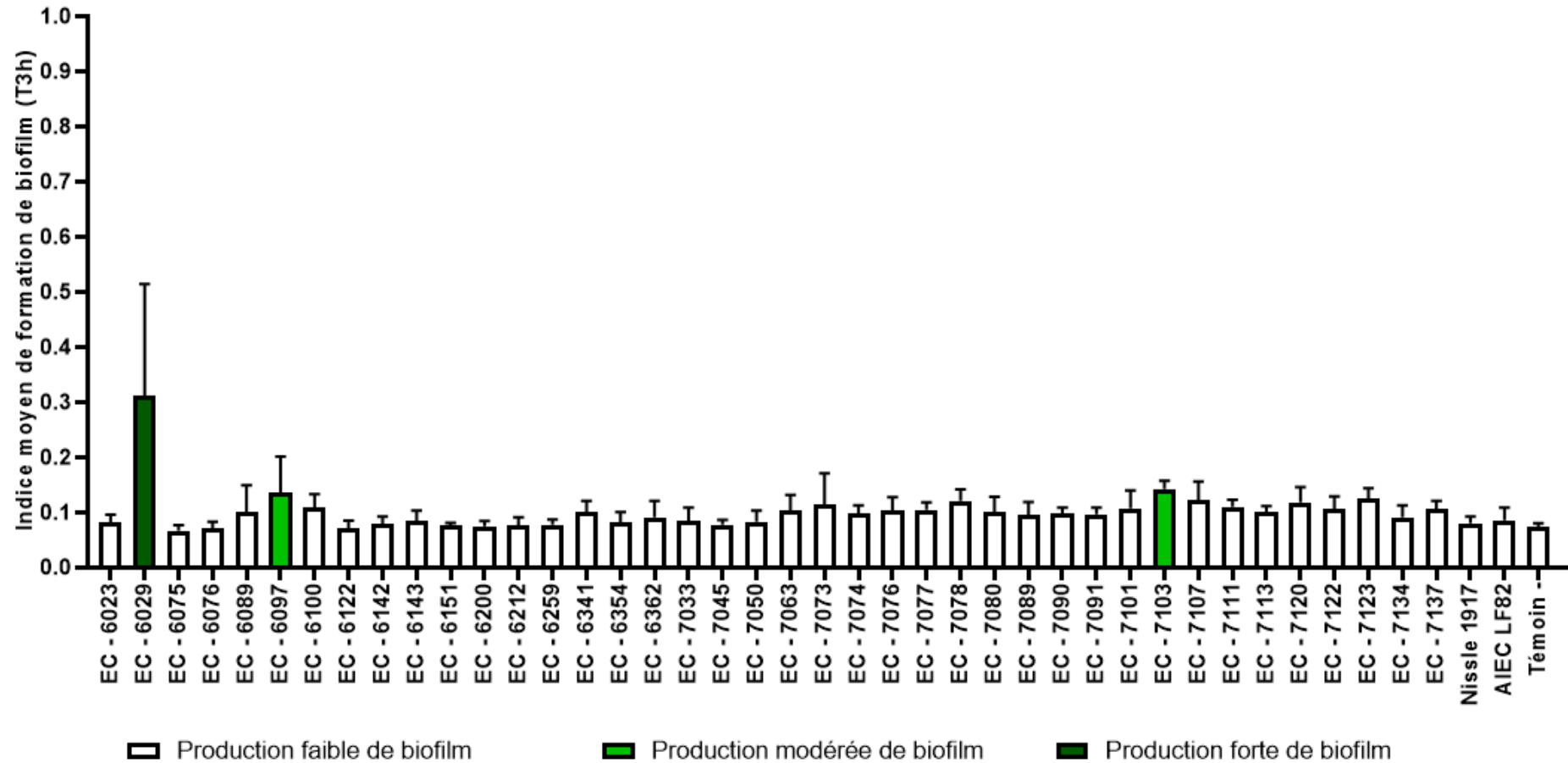


Figure 22. Evaluation de l'indice moyen de formation de biofilm des souches *E. coli* issues de la collection clinique, de la souche Nissle 1917 et la souche AIEC LF82 (n = 42). Les souches présentant un indice moyen inférieur à 0,14 étaient associées à une faible production de biofilm. Les clones associés à un indice moyen de formation de biofilm strictement supérieur à 0,14 et strictement inférieur à 0,28 étaient affiliés à une production modérée de biofilm. Les souches présentant un indice moyen de formation de biofilm supérieur ou égal à 0,28 étaient associées à une forte production de biofilm.

4.2.2.1. Biofilm et invasivité des souches

Compte tenu des résultats obtenus, la formation de biofilm a été étudiée sur une durée équivalente (3 heures) au temps d'infection des tests d'invasion réalisés. Les souches cytotoxiques et résistantes à la gentamicine ont été exclues de l'analyse.

Parmi les souches identifiées comme invasives sur la lignée épithéliale I-407 (n = 34), 25 souches étaient affiliées au phénotype « producteur de biofilm faible », 6 souches étaient affiliées au phénotype « producteur de biofilm modéré », 3 souches présentaient une capacité de production de biofilm forte ([Tableau 18](#)). Parmi les souches identifiées comme non invasives sur la lignée épithéliale I-407 (n = 67), 52 souches étaient définies comme des souches productrices de biofilm faible, 11 souches comme productrices de biofilm modérée et 4 souches comme des souches fortement productrices de biofilm ([Tableau 18](#)). L'indice IFB moyen des souches invasives sur I-407 était plus élevé que l'indice IFB moyen des souches non invasives sur I-407 ($IFB_{Inv} = 0,14 \pm 0,09$; $IFB_{N-inv} = 0,13 \pm 0,08$; $p\text{-value} = 0,11$).

Sur le même principe, la formation de biofilm des souches a été comparée à l'invasion sur lignée épithéliale Caco-2/TC-7. Parmi les souches non invasives sur la lignée Caco-2/TC-7 (n = 50), 41 souches étaient associées au phénotype « producteur de biofilm faible », 8 souches présentaient une production modérée de biofilm et 1 souche était affiliée au phénotype « producteur fort de biofilm » ([Tableau 18](#)). Parmi les souches invasives sur la lignée Caco-2/TC-7 (n = 50), 35 souches présentaient un phénotype « producteur de biofilm faible », 9 souches étaient associées à une production modérée de biofilm et 6 souches présentaient une production de biofilm forte ([Tableau 18](#)). L'indice IFB moyen des souches invasives sur Caco-2/TC-7 était plus élevé que l'indice IFB moyen des souches non invasives ($IFB_{Inv} = 0,15 \pm 0,11$; $IFB_{N-inv} = 0,12 \pm 0,04$; $p\text{-value} = 0,99$).

Phénotype bactérien	Lignée cellulaire I-407		Lignée cellulaire Caco-2/TC-7	
	SI < 0,1 % (n = 67)	SI ≥ 0,1 % (n = 34)	SI < 0,1 % (n = 50)	SI ≥ 0,1 % (n = 50)
Production de biofilm faible (IFB < 0,14)	52	25	41	35
Production de biofilm modérée (0,14 ≤ IFB < 0,28)	11	6	8	9
Production de biofilm forte (IFB ≥ 0,28)	4	3	1	6

Tableau 18. Evaluation de la corrélation entre l'invasion des souches et la production de biofilm des souches E. coli issues de la collection ECOR et clinique (n=101 pour la lignée I-407 ; n = 100 pour la lignée Caco-2/TC-7). Aucune corrélation n'a été observée par le test Chi-2 (invasivité sur I-407 et biofilm : p-value = 0,21 ; invasivité sur Caco-2/TC-7 et biofilm : p-value = 0,27).

4.2.2.2. Biofilm et survie des souches

L'existence d'une corrélation a également été évaluée entre la capacité ou non de former du biofilm sur 3 heures à une survie bactérienne intracellulaire. Parmi les souches identifiées comme capables de survivre au sein des macrophages J774-A1 (n=61), 48 souches étaient affiliées au phénotype « producteur de biofilm faible », 10 souches étaient affiliées au phénotype « producteur de biofilm modéré », 3 souches présentaient une capacité de production de biofilm forte ([Tableau 19](#)). Parmi les souches associées à une mort bactérienne sur la lignée J774-A1 (n = 48), 36 souches étaient définies comme des souches productrices de biofilm faible, 8 souches comme productrices de biofilm modéré et 4 souches comme des souches fortement productrices de biofilm ([Tableau 19](#)). L'indice IFB moyen des souches capables de survivre était plus élevée que l'indice IFB moyen des souches non invasives sur I-407 (IFB_{Sur} = 0,13 ± 0,09 ; IFB_{N-sur} = 0,13 ± 0,07 ; p-value = 0,92).

Lignée cellulaire J774-A1			
Phénotype bactérien	I_REPL < 100 % (n = 48)	100 % ≤ I_REPL < 200 % (n = 27)	I_REPL ≥ 200 % (n = 34)
Production de biofilm faible (IFB < 0,14)	36	18	30
Production de biofilm modérée (0,14 ≤ IFB < 0,28)	8	7	3
Production de biofilm forte (IFB ≥ 0,28)	4	2	1

Tableau 19. Évaluation de la corrélation entre la survie, la réplication et la mort bactérienne des souches et la production de biofilm (T3 heures) des souches *E. coli* issues de la collection ECOR et clinique (n = 109). Aucune corrélation n'a été démontrée par le test Chi-2 (p-value = 0,33).

4.2.2.3. Corrélation entre le biofilm, l'invasion et la survie des souches ?

A l'aide des résultats obtenus, les différentes corrélations ont été évaluées entre le biofilm (présence, degré), l'invasivité, la survie et la réplication intracellulaire au sein des macrophages. Pour l'ensemble des données, un tableau de contingence a été réalisé pour évaluer l'existence d'un lien ou non entre les données présentées. Les résultats issus des analyses à l'aide du test Chi-2 sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 20).

	Production / Absence de biofilm (T3h)	Production faible / modérée / forte de biofilm (T3h)
Invasion / Absence d'invasion sur cellules I-407	0,65	0,85
Invasion / Absence d'invasion sur cellules Caco-2/TC-7	0,27	0,13
Mort / Survie bactérienne	0,65	0,76
Mort / Survie / Réplication bactérienne	0,12	0,33

Tableau 20. Évaluation d'une existence de corrélation entre le biofilm (absence, présence, niveaux) et l'invasivité (lignées cellulaires I-407 et Caco-2/TC-7) ou la survie bactérienne (mort, survie, réplication bactérienne). Les valeurs représentées sont les p-value obtenues à partir du test de Chi-2.

L'évaluation de la capacité des souches à produire du biofilm sur une durée plus courte, c'est-à-dire de 3 heures, n'a pas mis en évidence une corrélation significative entre leur phénotype, l'invasivité ou une survie bactérienne au sein des macrophages.

4.3. Tests d'infection en HCS

4.3.1. Mise au point du test d'infection sur lignée épithéliale I-407

4.3.1.1. Application du test conventionnel au test d'infection par HCS

L'un des objectifs de la thèse était de mettre au point un test d'infection utilisant l'imagerie à haut contenu pour distinguer les souches invasives des souches non invasives définies en test conventionnel. La miniaturisation du test a impliqué une pré-validation des paramètres d'infection sur le plan cellulaire (densité cellulaire, marquage de l'ADN nucléaire au DAPI et marquage cytoplasmique à l'aide du HCS CellMask bleu) et bactérien (multiplicité d'infection et marquage bactérien à l'aide d'un anticorps anti-LPS). La validation de ces paramètres a permis la mise au point d'un script analytique en vue d'une sélection des différents éléments de l'image, ici les structures cellulaires (noyaux, cellules non infectées et infectées) et les bactéries (intracellulaires et extracellulaires) (*Figure 23*). L'application de l'algorithme permettait le recensement par puits du nombre de cellules, du nombre de bactéries, du

nombre de cellules infectées, du pourcentage de cellules infectées, de l'aire bactérienne intracellulaire et de l'aire cellulaire des cellules infectées. L'application du script fournit également des données associées au ratio moyen de l'aire bactérienne par rapport à l'aire cellulaire infectée, au rapport de l'aire bactérienne par rapport à l'aire des cellules infectées, au rapport de l'aire bactérienne par rapport à l'aire cellulaire des cellules sélectionnées. En vue d'une diminution de faux positifs, des ajustements du seuil de détection des spots bactériens en fonction de l'intensité de fluorescence ainsi que le nombre minimal de bactéries intracellulaires à considérer ont été également validés. Sur la base de ce script, les souches définies précédemment comme souches invasives, non invasives, cytotoxiques et résistantes à la gentamicine ont été criblées (n = 112).

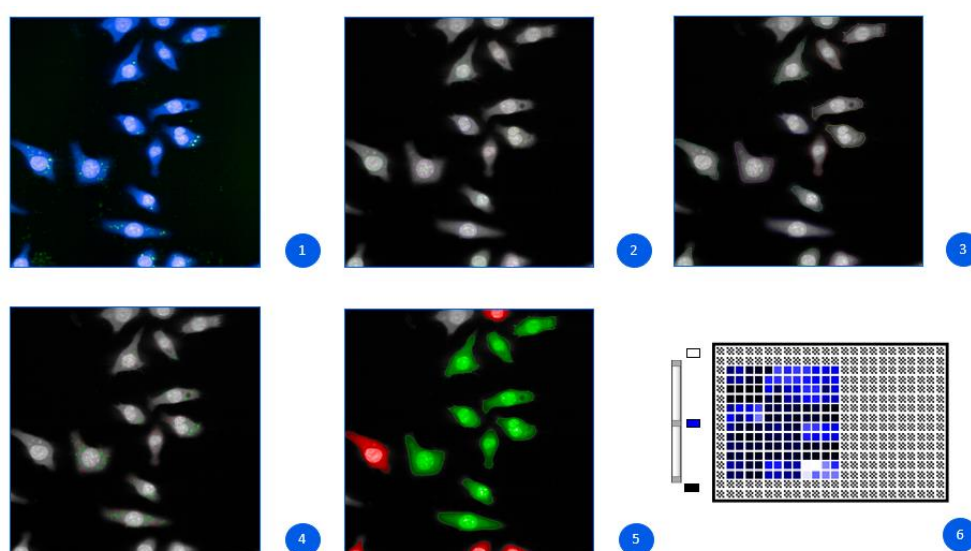


Figure 23. Etapes du script analytique en vue de distinguer les cellules infectées par AIEC LF82 en vert et les cellules non infectées en rouge : (1) : Image initiale. (2) : Délimitation nucléaire. (3) : Délimitation cytoplasmique. (4) : Sélection des spots bactériens selon l'intensité de fluorescence. (5) : Mise en évidence des cellules infectées en vert et les cellules non infectées en rouge. (6) : Visualisation colorimétrique des cellules infectées sur une plaque. Les bactéries sont identifiées par détection immunitaire (vert) ; Les cellules épithéliales sont contrastées par les noyaux marqués DAPI (bleu) et les cytoplasmes marqués au Cell Mask Blue. Grossissement d'origine $\times 60$.

4.3.1.2. Criblage et caractérisation des souches par HCS

La validation du script a été évaluée sur la totalité des souches (n = 112 sur un ensemble de 4 puits par souche au minimum) incluant les souches cytotoxiques et les souches résistantes à la gentamicine. Pour chaque puits, une comparaison a été réalisée entre les

données obtenues en culture cellulaire conventionnelle, les images obtenues en HCS et les données obtenues à partir du script d'analyse. Les critères pris en compte étaient : l'adéquation entre l'image (nombre de cellules, proportion de bactéries intracellulaires, présence de biofilm) et les données acquises du logiciel Columbus™ ; la corrélation entre le score d'invasion des souches en culture cellulaire conventionnel et le pourcentage de cellules infectées. Suivant ces critères présentés, les 112 souches ont été validées en HCS et ont permis d'évaluer l'infection par imagerie.

Parmi les données obtenues, le pourcentage de cellules infectées a été sélectionné pour évaluer le seuil arbitraire définissant le caractère invasif des souches sur 2 multiplicités d'infection (MOI 10 et MOI 50). Un seuil arbitraire de 15 % a été retenu pour évaluer la distinction des souches potentiellement non invasives (souches négatives) et de souches potentiellement invasives (souches positives). En s'appuyant sur ce critère, un recensement des souches négatives et positives sur l'ensemble des collections ECOR et souches cliniques sur la lignée épithéliale I-407 sur deux multiplicités d'infection (MOI 10 et MOI 50) a été réalisée (*Tableau 21, Figures 24 à 27*). A une MOI de 10, 52 % des souches présentaient un PCI strictement inférieur à 15 % ($n = 53$; $PCI_{MOI\ 10} = 5 \pm 4$) et 48 % des souches présentaient un PCI supérieur ou égal à 15% ($n = 48$; $PCI_{MOI\ 10} = 31 \pm 12$). A une MOI 50, 63 % des souches étaient associées à un PCI strictement inférieur à 15 % ($n = 64$; $PCI_{MOI\ 50} = 5 \pm 4$) et 37 % des souches étaient associées à un PCI supérieur ou égal à 15 % ($n = 37$; $PCI_{MOI\ 50} = 33 \pm 14$). Aucune différence n'a été soulignée sur le pourcentage de cellules infectées suivant la multiplicité d'infection employée ($n = 101$; $PCI_{MOI\ 50} = 15 \pm 16$; $PCI_{MOI\ 10} = 17 \pm 15$; $p\text{-value} = 0,23$).

	MOI 10 (n = 101)	MOI 50 (n = 101)
Souches positives (PCI ≥ 15 %)	53	64
Souches négatives (PCI < 15 %)	48	37

Tableau 21. Proportion des souches positives et négatives attribuées selon le pourcentage de cellules infectées suivant deux multiplicités d'infection (MOI 10 ; MOI 50) sur la lignée épithéliale I-407.

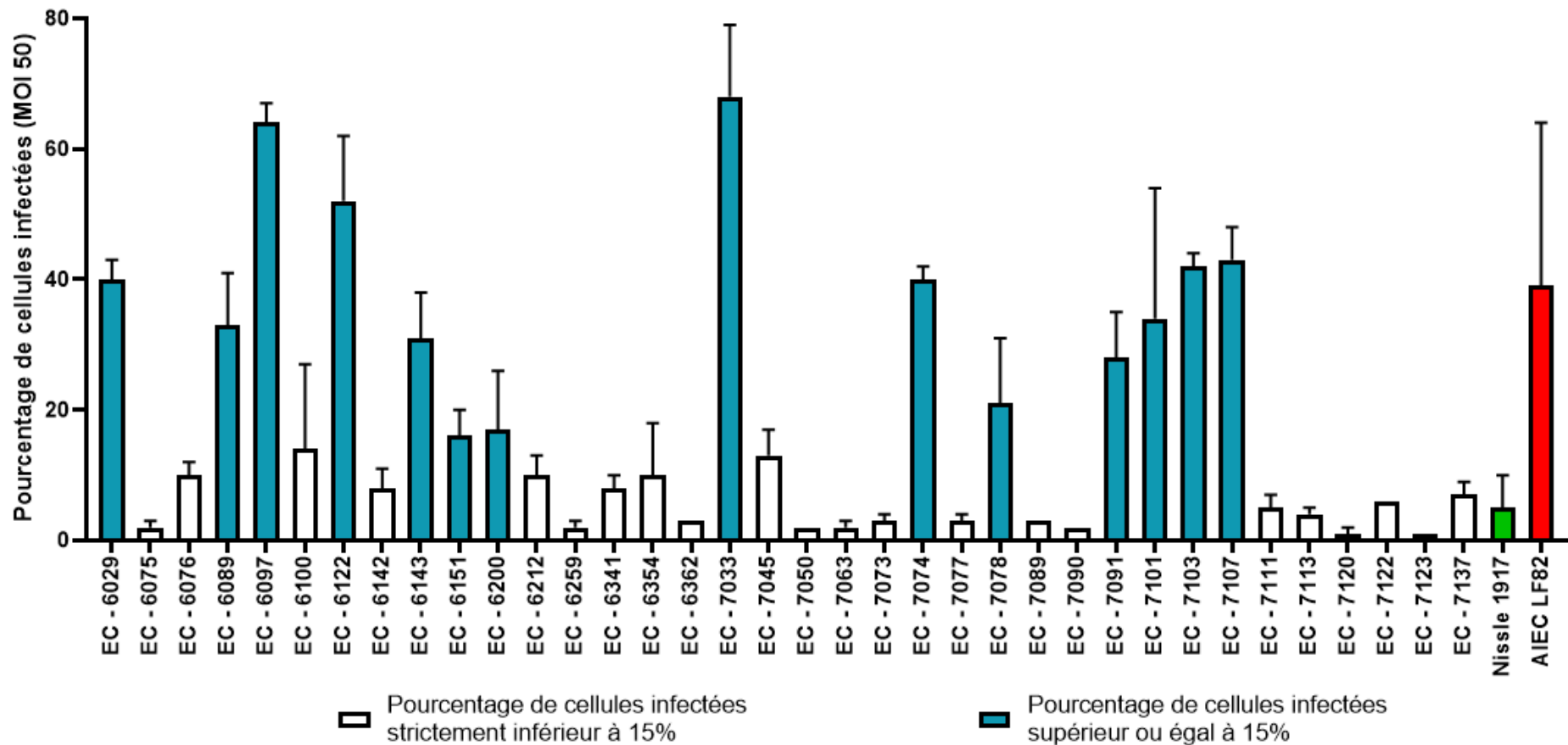


Figure 24. Évaluation du pourcentage de cellules infectées (PCI) à 3 h post-infection (MOI 50) sur cellules épithéliales I-407. Une segmentation des souches *E. coli* issues de la collection clinique ($n = 38$ incluant la souche probiotique Nissle 1917 et la souche AIEC LF82) a été réalisée à partir de la valeur du pourcentage de cellules infectées ($n = 23$ pour les souches associées à un PCI strictement inférieur à 15 % ; $n = 15$ pour les souches associées à un PCI supérieur ou égale à 15%).

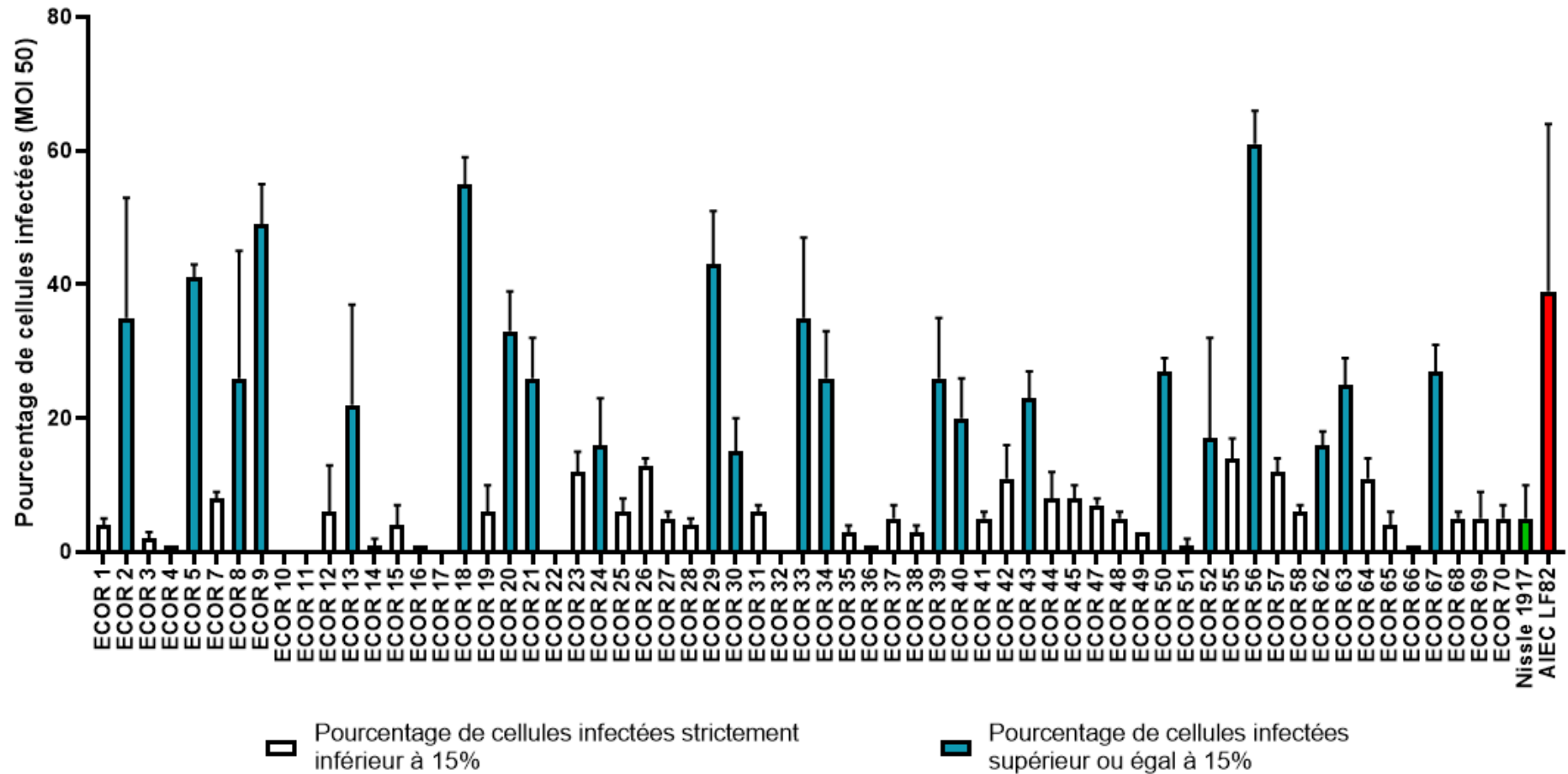


Figure 25. Évaluation du pourcentage de cellules infectées (PCI) à 3 h post-infection (MOI 50) sur cellules épithéliales I-407. Une segmentation des souches *E. coli* issues de la collection ECOR ($n = 65$ incluant la souche probiotique Nissle 1917 et la souche AIEC LF82) a été réalisée à partir de la valeur du pourcentage de cellules infectées ($n = 42$ pour les souches associées à un PCI strictement inférieur à 15 % ; $n = 23$ pour les souches associées à un PCI supérieur ou égale à 15%).

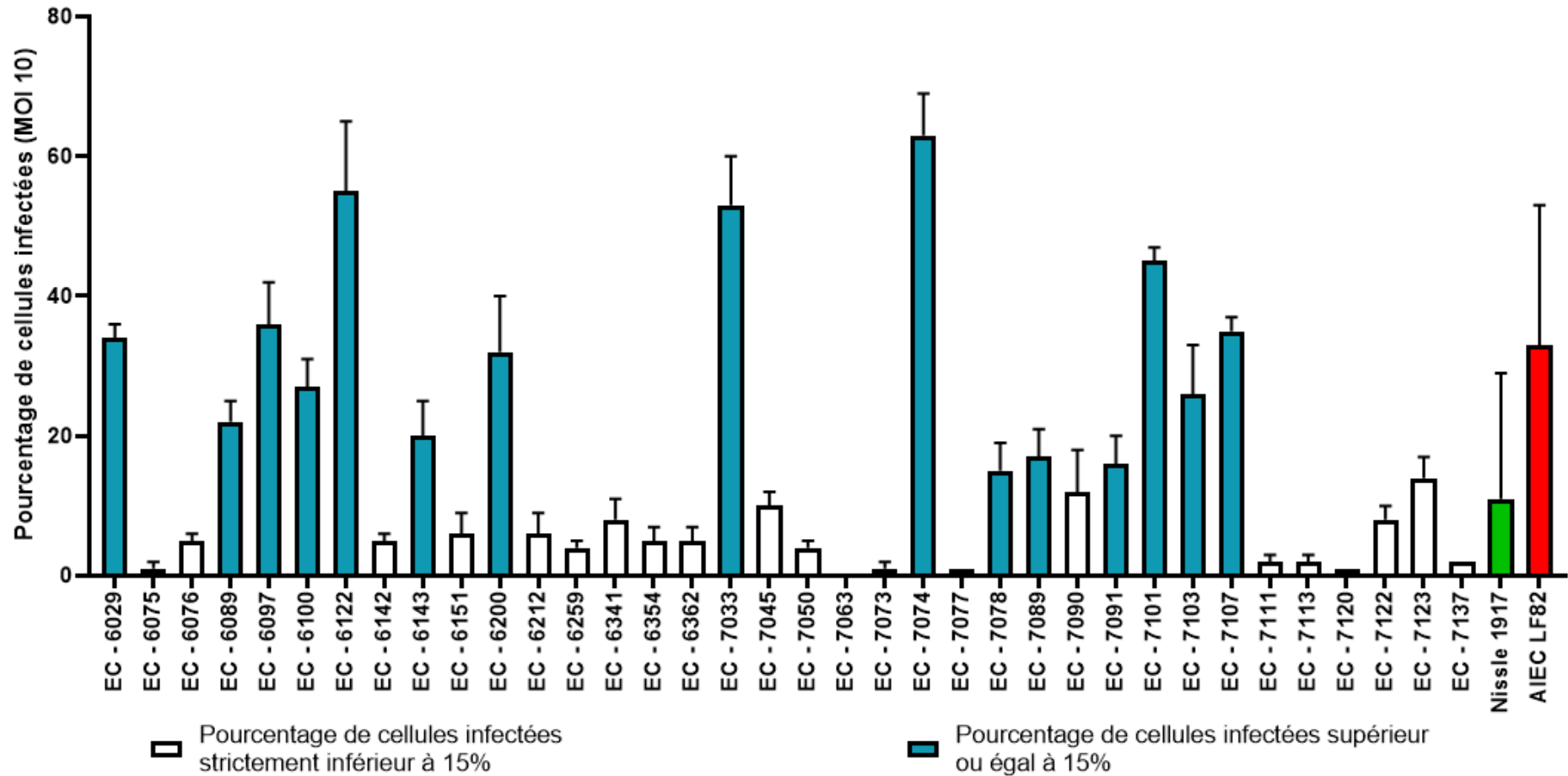


Figure 26. Evaluation du pourcentage de cellules infectées (PCI) à 3 h post-infection (MOI 10) sur cellules épithéliales I-407. Une segmentation des souches *E. coli* issues de la collection clinique ($n = 38$ incluant la souche probiotique Nissle 1917 et la souche AIEC LF82) a été réalisée à partir de la valeur du pourcentage de cellules infectées ($n = 22$ pour les souches associées à un PCI strictement inférieur à 15 % ; $n = 16$ pour les souches associées à un PCI supérieur ou égale à 15%).

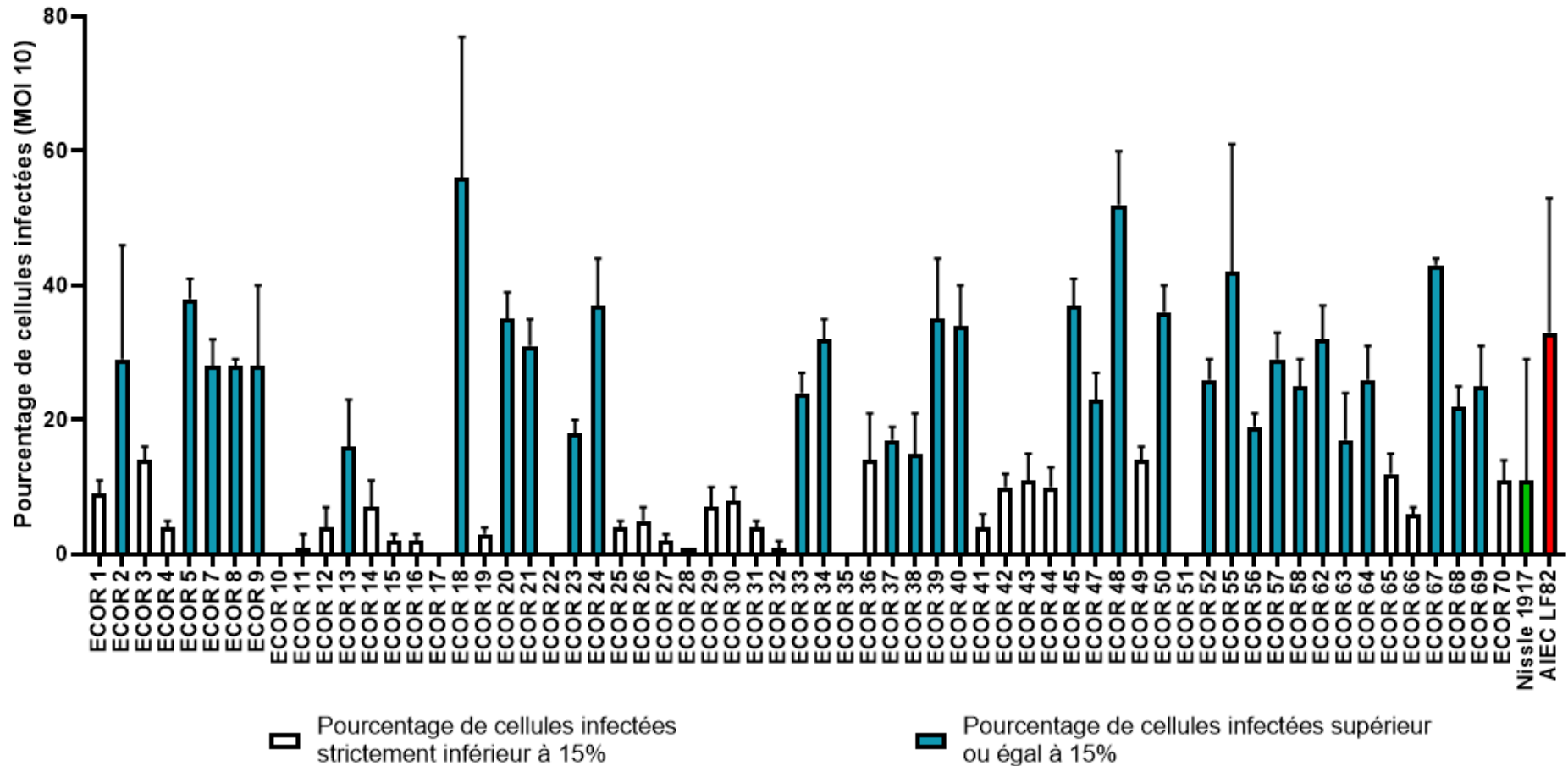


Figure 27. Evaluation du pourcentage de cellules infectées (PCI) à 3 h post-infection (MOI 10) sur cellules épithéliales I-407. Une segmentation des souches *E. coli* issues de la collection ECOR ($n = 65$ incluant la souche probiotique Nissle 1917 et la souche AIEC LF82) a été réalisée à partir de la valeur du pourcentage de cellules infectées ($n = 32$ pour les souches associées à un PCI strictement inférieur à 15 % ; $n = 33$ pour les souches associées à un PCI supérieur ou égale à 15%).

Comparativement aux données obtenues en culture conventionnelle (proportion de souches invasives et de souches non invasives), une analyse statistique à l'aide du test de Chi-2 était réalisée pour définir par imagerie les souches invasives et les souches non invasives (*Tableau 22*). En nous basant sur ces critères, une valeur seuil de 15 % discriminant les souches positives (PCI \geq 15%) des souches négatives (PCI < 15%) a été retenue (MOI 10, *** p -value = 0,0002 ; MOI 50, ** p -value = 0,0018).

	Souches invasives (SI \geq 0,1 % ; n = 35)	Souches non invasives (SI < 0,1 % ; n = 66)
Souches positives (PCI \geq 15 % ; MOI 10)	24	20
Souches négatives (PCI < 15 % ; MOI 10)	11	46
Souches positives (PCI \geq 15 % ; MOI 50)	20	17
Souches négatives (PCI < 15 % ; MOI 50)	15	49

Tableau 22. Corrélation entre les souches positives et négatives attribuées selon le pourcentage de cellules infectées (MOI 10 ; MOI 50) aux souches invasives et non invasives obtenues par tests conventionnels sur la lignée épithéliale I-407. Les valeurs indiquées représentent le nombre des souches suivant les conditions.

4.3.1.3. Étude de la performance du test

Tenant compte de ces résultats et de cette corrélation significative, la performance du test a été évaluée. La performance du test a été étudiée suivant la spécificité, la sensibilité, le taux de faux positifs, le taux de faux négatifs, la précision, le rapport de vraisemblance positif, le rapport de vraisemblance négatif, le risque relatif, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative. Les valeurs associées sont mentionnées dans le tableau ci-dessous (*Tableau 23*).

	MOI 10	MOI 50
Sensibilité	0,69	0,57
Spécificité	0,70	0,74
Taux de faux positifs (TFP)	0,30	0,26
Taux de faux négatifs (TFN)	0,31	0,43
Rapport de vraisemblance positif (LR+)	2,3	2,2
Rapport de vraisemblance négatif (LR-)	0,44	0,58
Risque relatif	2,83	2,31
Valeur prédictive positive	0,55	0,54
Valeur prédictive négative	0,81	0,77

Tableau 23. Evaluation de la performance du test d'invasion par imagerie à haut contenu comparativement à la technique gold standard selon le pourcentage de cellules infectées (MOI 10 ; MOI 50) sur la lignée épithéliale I-407.

Pour le test réalisé en imagerie à haut contenu à MOI 10 sur notre collection de souches, la distinction suivant la valeur seuil de 15 % de cellules infectées a permis d'obtenir un taux de faux positifs de 0,30 et un taux de faux négatifs de 0,31. Les résultats obtenus sur les tests d'infection à MOI 50 mettent en évidence un taux de faux positifs moindre (0,26) et un taux de faux négatifs plus élevé (0,31). Toutefois, en s'intéressant à la sensibilité et à la spécificité des deux tests d'infections (MOI 10 et MOI 50), aucune différence significative a été relevée (test de Chi-2 : sensibilité, p -value = 0,32 ; spécificité, p -value = 0,56). L'étude de la performance du test a également mis en évidence qu'une souche invasive est 2,3 fois (2,2 pour la MOI 50) plus probablement discriminée comme étant une souche positive qu'une souche non invasive. Aussi, une souche invasive est 0,44 (0,58 pour la MOI 50) fois plus susceptible d'être discriminée comme étant négative qu'une souche non invasive. Face à ces résultats, les valeurs de LR+ et LR- témoignent que le test est plus susceptible de distinguer les souches invasives que les souches non invasives. De plus, tenant compte de la prévalence des souches invasives dans la collection, la valeur prédictive positive démontre une probabilité de 55 % (54 % pour la MOI 50) que la souche discriminée comme positive est réellement

invasive. La valeur prédictive négative démontre que dans 81 % (77 % pour la MOI 50) des cas, la souche identifiée comme négative est non invasive.

Face à ces résultats et de notre objectif prioritaire de détecter les souches invasives comme les souches positives, une analyse statistique sur une nouvelle valeur seuil peut être envisagée tout en privilégiant la sensibilité du test.

4.3.2. Mise au point du test d'infection sur lignée épithéliale Caco-2/TC-7

4.3.2.1. Application du test conventionnel au test d'infection par HCS

Pour définir les souches négatives et les souches positives, le même raisonnement a été appliqué sur la lignée épithéliale Caco-2/TC-7. Compte tenu de la différence morphologique des cellules vis-à-vis des cellules I-407, un ajustement du script analytique a été réalisé sur la détection de la structure cytoplasmique et nucléaire.

4.3.2.2. Criblage et caractérisation des souches par HCS

Tout comme la lignée cellulaire I-407, une pré-validation du script analytique pour évaluer la corrélation entre les images obtenues et les données associées obtenues par HCS. Le script analytique a été éprouvé sur un ensemble de souches excluant les souches cytotoxiques et résistantes à la gentamicine ($n = 65$). Sur ce panel de souches, une distinction des souches positives (pourcentages de cellules infectées supérieur ou égal à 15 %) et des souches négatives (pourcentage de cellules infectées inférieur à 15 %) a été réalisée. La proportion des souches positives et des souches négatives (en fonction de la multiplicité d'infection et du score d'invasion) est représentée dans le tableau ci-dessous ([Tableau 24](#)).

A une MOI de 10, 62 % des souches présentaient un PCI strictement inférieur à 15 % ($n = 40$; $PCI_{MOI\ 10} = 2 \pm 4$) et 48 % des souches présentaient un PCI supérieur ou égal à 15% ($n = 25$; $PCI_{MOI\ 10} = 29 \pm 12$). A une MOI 50, 52 % des souches étaient associées à un PCI strictement inférieur à 15 % ($n = 34$; $PCI_{MOI\ 50} = 7 \pm 4$) et 48 % des souches étaient associées à un PCI supérieur ou égal à 15 % ($n = 31$; $PCI_{MOI\ 50} = 37 \pm 17$). Le pourcentage de cellules infectées moyen était significativement plus élevé quand la multiplicité d'infection employée était de 50 ($n = 65$; $PCI_{MOI\ 50} = 21 \pm 19$; $PCI_{MOI\ 10} = 13 \pm 15$; *** p -value = 0,0005).

	MOI 10 (n = 65)	MOI 50 (n = 65)
Souches positives (PCI ≥ 15 %)	40	34
Souches négatives (PCI < 15 %)	25	31

Tableau 24. Proportion des souches positives et négatives attribuées selon le pourcentage de cellules infectées suivant deux multiplicités d'infection (MOI 10 et MOI 50) sur la lignée épithéliale Caco-2/TC-7.

Comparativement aux données obtenues en culture conventionnelle (proportion de souches invasives et de souches non invasives), une analyse statistique à l'aide du test de Chi-2 était réalisée pour définir par imagerie les souches invasives et les souches non invasives (*Tableau 25, Figures 28 et 29*). Une valeur seuil de 15 % discriminant les souches positives (PCI ≥ 15%) des souches négatives (PCI < 15%) a été retenue (MOI 10, * *p-value* = 0,013 ; MOI 50, ** *p-value* = 0,0098).

	Souches invasives (SI ≥ 0,1 % ; n = 29)	Souches non invasives (SI < 0,1 % ; n = 36)
Souches positives (PCI ≥ 15 % ; MOI 10)	16	9
Souches négatives (PCI < 15 % ; MOI 10)	13	27
Souches positives (PCI ≥ 15 % ; MOI 50)	19	12
Souches négatives (PCI < 15 % ; MOI 50)	10	24

Tableau 25. Corrélation entre les souches invasives et non invasives attribuées selon le pourcentage de cellules infectées (MOI 10 et MOI 50) aux souches invasives et non invasives obtenues par tests conventionnels sur la lignée épithéliale Caco-2/TC-7. Les valeurs indiquées représentent la proportion des souches suivant les conditions.

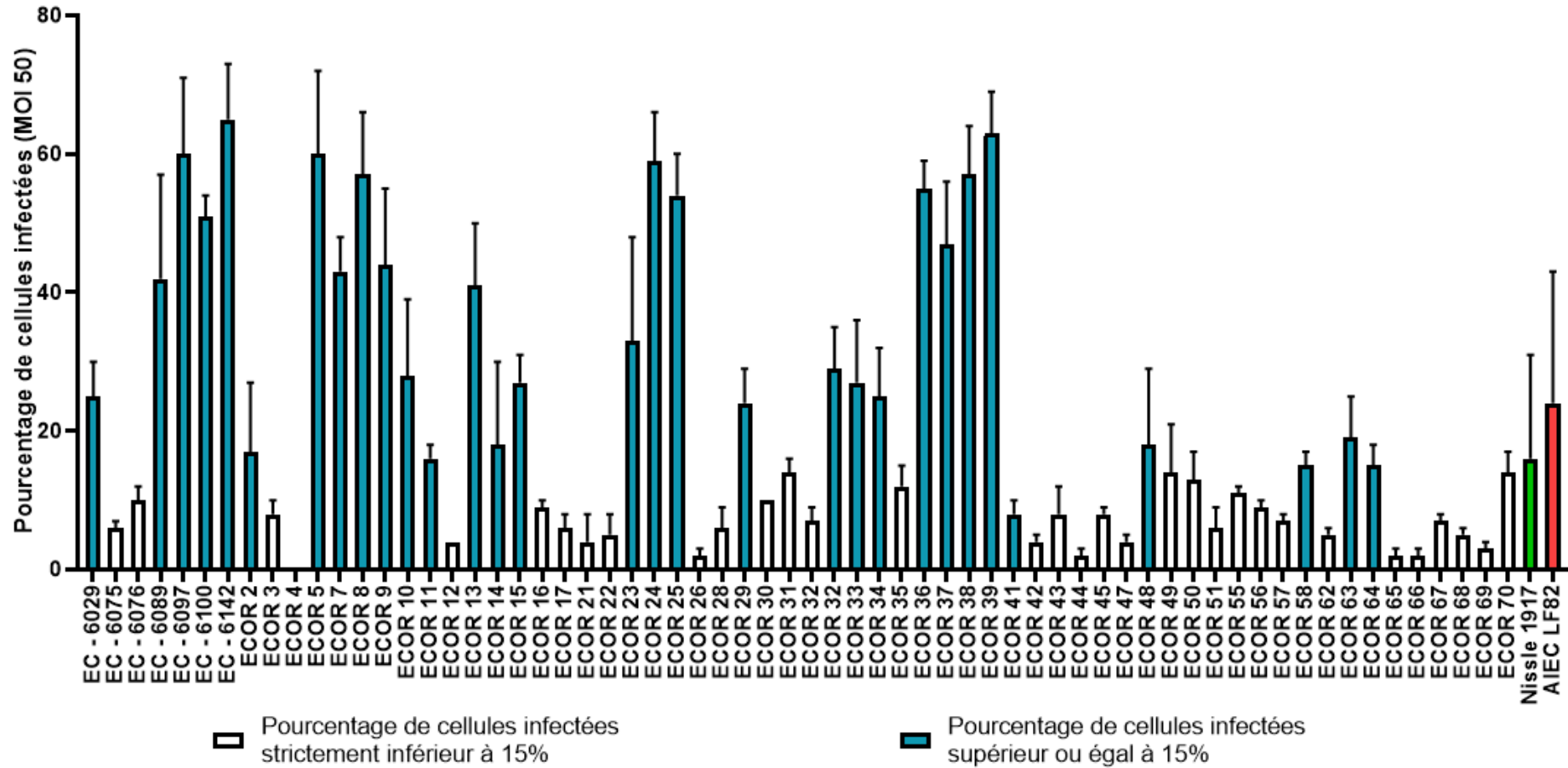


Figure 28. Evaluation du pourcentage de cellules infectées (PCI) à 3 h post-infection (MOI 50) sur cellules épithéliales Caco-2/TC-7. Une segmentation des souches *E. coli* issues de la collection clinique et ECOR ($n = 65$ incluant la souche probiotique Nissle 1917 et la souche AIEC LF82) a été réalisée à partir de la valeur du pourcentage de cellules infectées ($n = 34$ pour les souches associées à un PCI strictement inférieur à 15 % ; $n = 31$ pour les souches associées à un PCI supérieur ou égal à 15%).

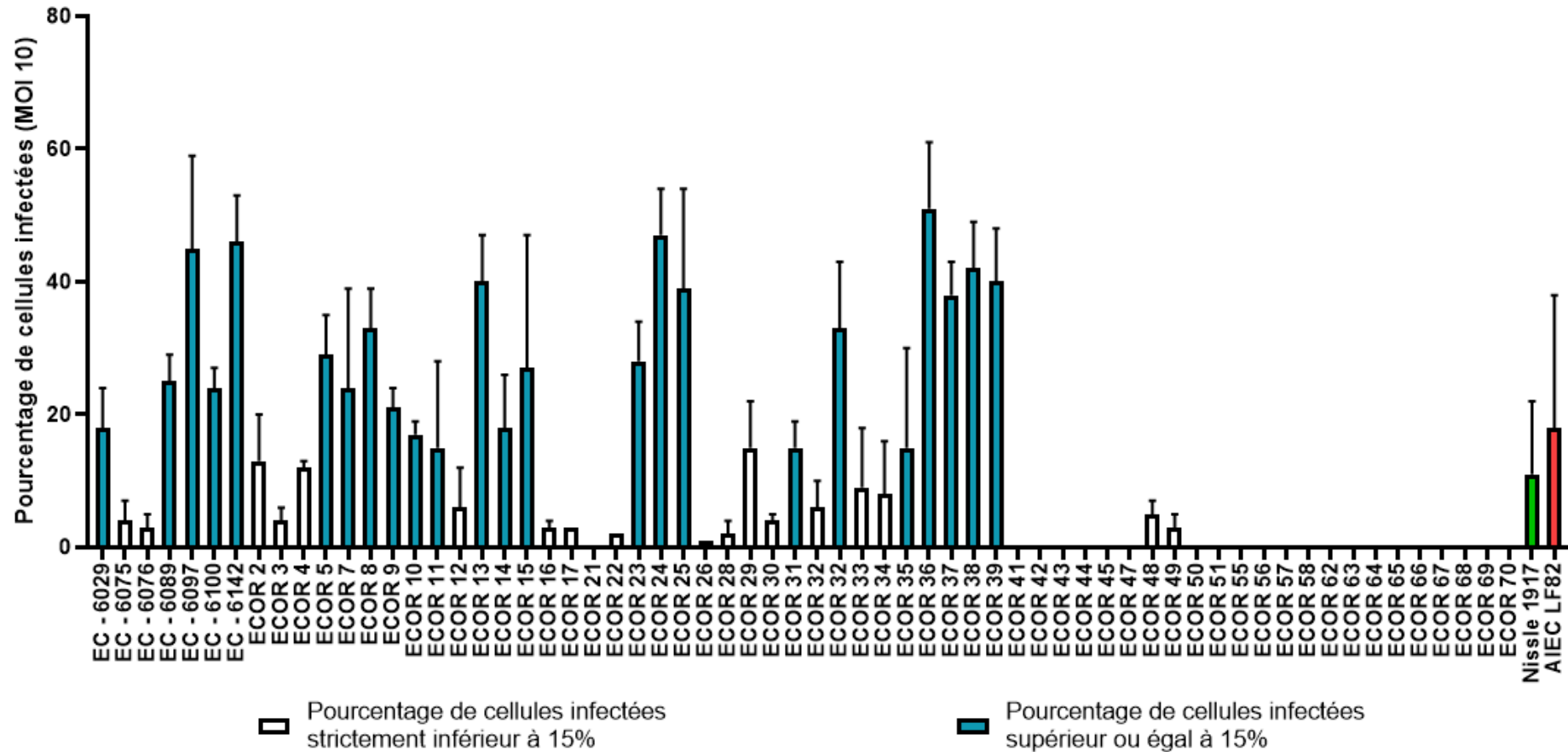


Figure 29. Evaluation du pourcentage de cellules infectées (PCI) à 3 h post-infection (MOI 10) sur cellules épithéliales Caco-2/TC-7. Une segmentation des souches *E. coli* issues de la collection clinique et ECOR ($n = 65$ incluant la souche probiotique Nissle 1917 et la souche AIEC LF82) a été réalisée à partir de la valeur du pourcentage de cellules infectées ($n = 40$ pour les souches associées à un PCI strictement inférieur à 15 % ; $n = 25$ pour les souches associées à un PCI supérieur ou égale à 15%).

4.3.2.3. Étude de la performance du test

La performance du test a également été réalisée sur les mêmes paramètres. Les valeurs associées en fonction des paramètres d'étude sont montrées dans le tableau ci-dessous (*Tableau 26*).

	MOI 10	MOI 50
Sensibilité	0,55	0,66
Spécificité	0,75	0,67
Taux de faux positifs (TFP)	0,25	0,33
Taux de faux négatifs (TFN)	0,45	0,34
Rapport de vraisemblance positif (LR+)	2,2	2
Rapport de vraisemblance négatif (LR-)	0,6	0,5
Risque relatif	1,97	2
Valeur prédictive positive	0,64	0,62
Valeur prédictive négative	0,68	0,71

Tableau 26. Evaluation de la performance du test d'invasion par imagerie à haut contenu comparativement à la technique gold standard selon le pourcentage de cellules infectées (MOI 10 ; MOI 50) sur la lignée épithéliale Caco-2/TC-7.

Le test réalisé à une MOI 10 sur la lignée cellulaire Caco-2/TC-7 met en évidence un test avec une spécificité plus élevée que la sensibilité, démontrée par un taux de faux négatifs plus élevé à 0,45 et un taux de faux positifs moindre s'élevant à 0,25.

Contrairement au test d'invasion sur cellules I-407, la spécificité du test est plus élevée ($Sp = 0,75$), démontrée par un taux de faux positifs plus faible ($TFP = 0,25$). Également, un taux de faux négatifs élevé a été également recensé ($TFN = 0,45$). En s'appuyant sur la spécificité et la sensibilité, la différence n'est pas significative entre le test d'infection à MOI 10 et MOI 50 (test de Chi-2 : sensibilité, $p\text{-value} = 0,42$; spécificité, $p\text{-value} = 0,44$). L'étude de la performance du test a également mis en évidence qu'une souche invasive est 2,2 fois (MOI 10 et MOI 50) plus probablement discriminée comme étant une souche positive qu'une souche non invasive. Aussi, une souche invasive est 0,6 (0,45 pour MOI 50) fois plus susceptible d'être discriminée comme étant négative qu'une souche non invasive. Face à ces résultats, les valeurs de LR+ et LR- témoignent que le test est plus susceptible de distinguer les souches invasives que les souches non invasives. De plus, tenant compte de la prévalence des souches

invasives dans la collection, la valeur prédictive positive démontre une probabilité de 64 % (62 % pour la MOI 50) que la souche discriminée comme positive est réellement invasive. La valeur prédictive négative démontre que dans 68 % (71 % pour la MOI 50) des cas, la souche identifiée comme négative est non invasive.

Comme pour la lignée épithéliale I-407, une nouvelle valeur seuil peut être envisagée en vue de privilégier la sensibilité du test et donc la probabilité de détecter une souche invasive comme étant une souche positive en HCS.

4.4. Caractérisation fonctionnelle du pathobionte sur modèle *C. elegans*

4.4.1. Colonisation d'*E. coli* et survie de *C. elegans*

Dans une première série d'expériences, nous avons évalué la durée de vie de *C. elegans* lors de l'infection par trois souches non invasives et non pathogènes d'*E. coli* (OP50, MG1655 et le probiotique EcN), et trois souches d'AIEC (LF82, LF06362 et NRG857c) (*Figure 30*). Les vers N2 se nourrissant d'OP50 ont montré la plus grande longévité, avec une LT50 de 16 jours. En revanche, la LT50 de *C. elegans* a été réduite à 11 à 13 jours par les autres souches bactériennes évaluées. Des différences significatives ont été observées entre OP50 d'une part et les souches non invasives EcN et MG1655 d'autre part ($p < 0,01$ dans un test de log-rank, *Figure 31A et 31B*). De plus, la LT50 était significativement plus courte pour MG1655 que pour EcN (*Figure 31C*). Si l'on considère les souches ayant des propriétés invasives, la LT50 était de 11 jours pour LF82 et EC-6362 et de 13 jours pour NRG857c. Alors que les courbes de survie de *C. elegans* pour les souches AIEC LF82 et EC-6362 étaient essentiellement superposables (*Figure 32A*), les durées de vie étaient significativement plus longues pour la souche MG1655 non invasive ($p < 0,01$ dans un test log-rank, *Figure 33A et 33B*) et l'AIEC NRG857c ($p < 0,01$, *Figure 32A et 32B*). De manière inattendue, la durée de vie de *C. elegans* était plus longue pour le pathobionte profibrogène NRG857c que pour le MG1655 non invasif (*Figure 33C*).

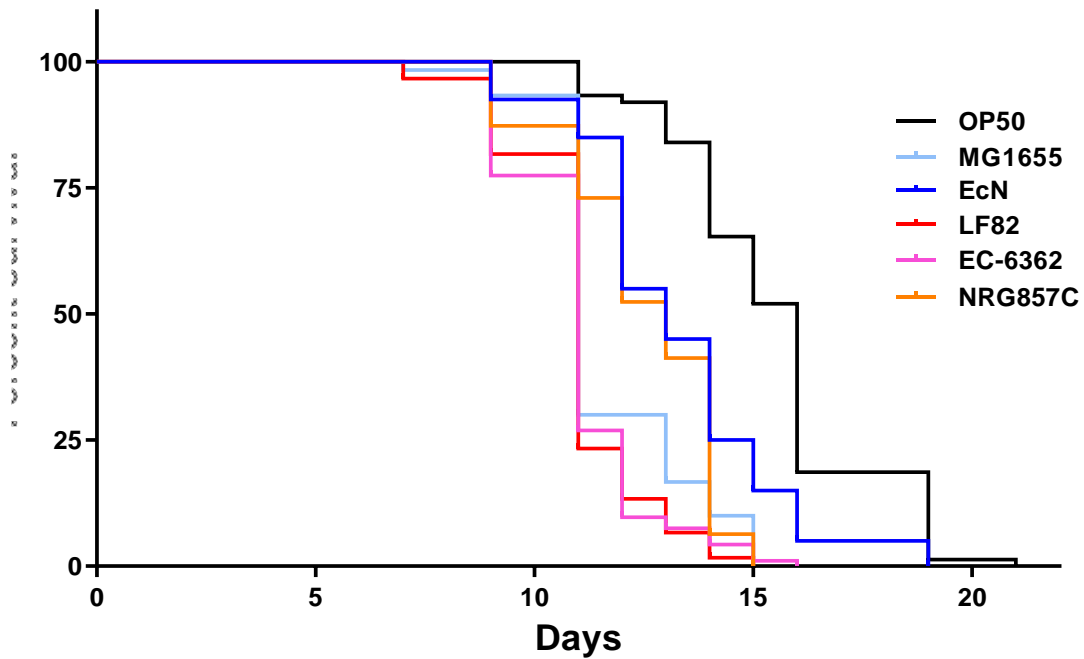


Figure 30. Diagrammes de survie Kaplan-Meier des essais de destruction de *C. elegans* (N2) infecté par six souches différentes d'*E. coli*. Les larves L4 ont été transférées sur des pelouses contenant OP50 (la souche de contrôle : n=84), MG1655 (n=74), EcN (n=45), LF82 (n=78), EC-6362 (n=101), et NRG857C (n=65).

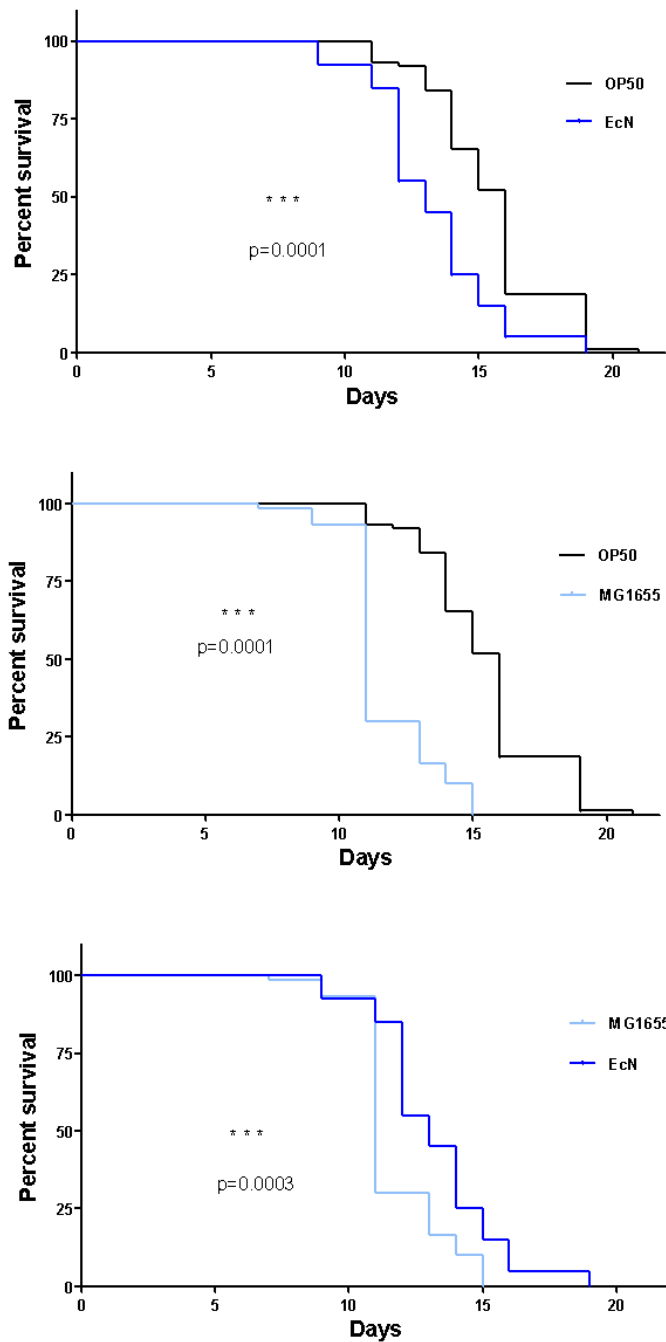


Figure 31. Comparaisons par paire des effets des souches d'*E. coli* sur la durée de vie de *C. elegans*. (A) OP50 ($n=84$) vs. EcN ($n=45$). (B) OP50 ($n=84$) vs. MG1655 ($n=74$). (C) MG1655 ($n=74$) vs. EcN ($n=45$). La signification statistique des différences entre les groupes a été évaluée à l'aide d'un test log-rank (Mantel-Cox) ; *** : $p < 0,001$.

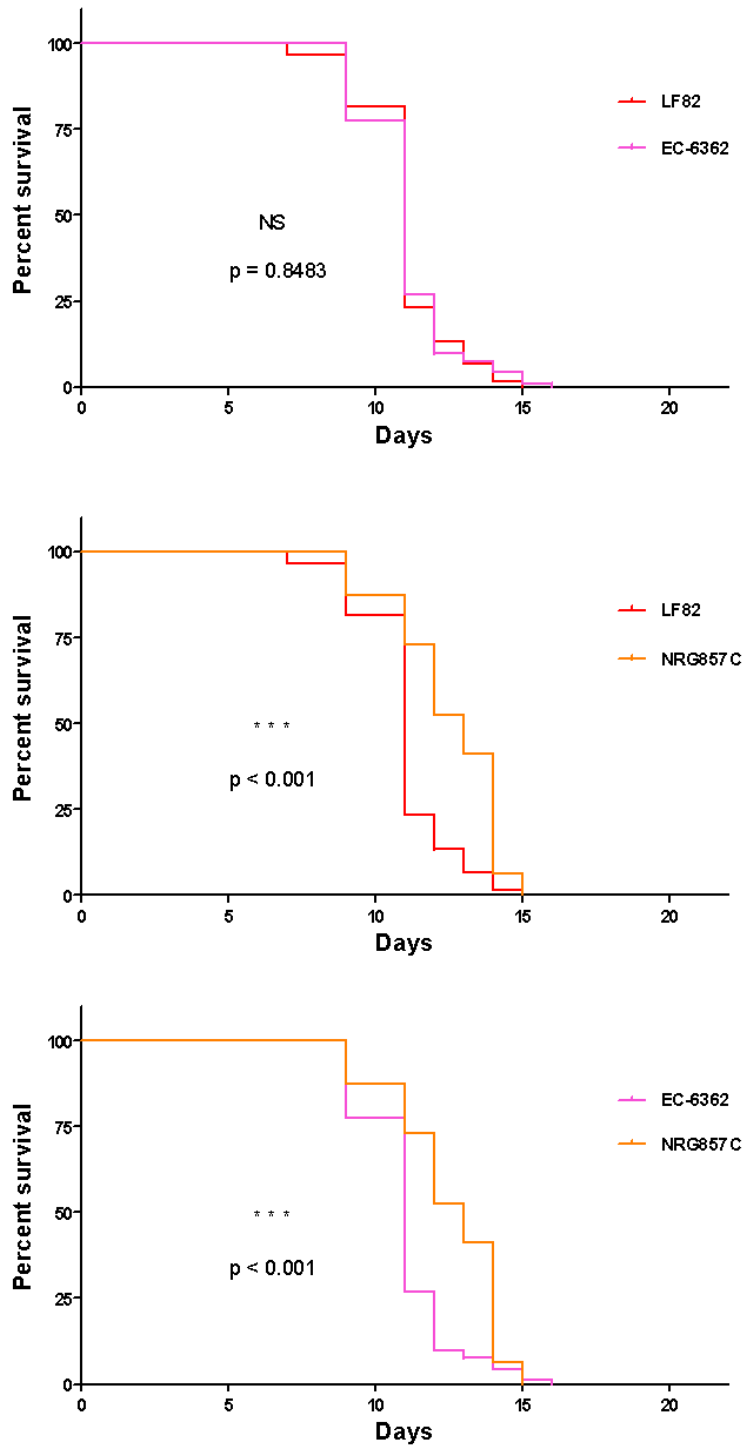


Figure 32. Comparaisons par paires des effets de modulation de la durée de vie de *C. elegans* par les souches d'*E. coli* (A) LF82 (n=78) vs. EC-6362 (n=101). (B) LF82 (n=78) vs. NRG857c (n=65). (C) EC-6362 (n=101) vs NRG857c (n=65). La signification statistique des différences entre les groupes a été évaluée à l'aide d'un test log-rank (Mantel-Cox) ; *** : $p < 0,001$; NS : non significatif).

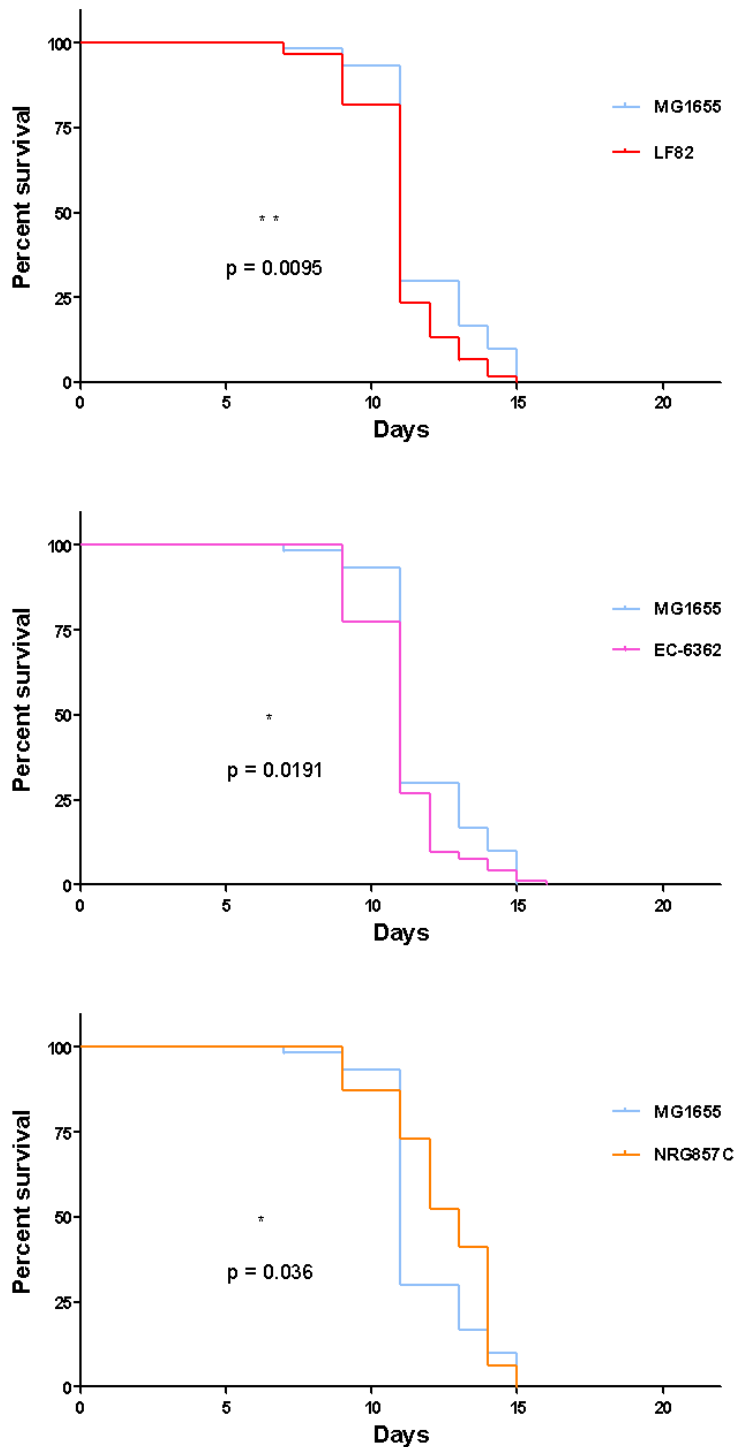


Figure 33. Comparaisons par paires des effets de modulation de la durée de vie de *C. elegans* par les souches d'*E. coli* (A) MG1655 (n=74) vs LF82 (n=78). (B) MG1655 (n=74) vs. EC-6362 (n=101). (C) MG1655 (n=74) vs NRG857c (n=65). La signification statistique des différences entre les groupes a été évaluée à l'aide d'un test log-rank (Mantel-Cox) ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$).

De toutes les souches étudiées ici, l'EcN anti-inflammatoire était associée à la durée de vie la plus longue (à l'exception de l'OP50, dont le faible taux de prolifération dans l'intestin maximise la durée de vie de *C. elegans*), par rapport à l'AIEC NRG857c ($p = 0,0327$, données non montrées). Dans l'ensemble, le phénotype AIEC ne semble pas être étroitement associé à un raccourcissement de la durée de vie de *C. elegans*.

4.4.2. Profils invasifs *in vitro* et *in vivo*

Par définition, une AIEC doit avoir un ratio d'invasion de 0,1% de l'inoculum initial à une MOI de 10 sur des cellules épithéliales I-407. Compte tenu de ce seuil quelque peu arbitraire, les souches individuelles peuvent présenter différents niveaux d'invasivité et/ou d'invasivité limite. Ces propriétés spécifiques aux souches ont été mises en évidence par la microscopie confocale d'*E. coli* intracellulaires colorés (Figure 33). Nous avons effectué des tests d'invasion avec 16 isolats humains d'*E. coli* sélectionnés comme étant des AIEC putatifs, ainsi qu'avec MG1655 et LF82 (Figure 34). Le degré d'invasivité allait de non invasif (ratio d'invasion < 0,1%) pour MG1655, EC-7090 et 7113 à modéré (ratio d'invasion entre 0,1 et 0,25%) pour EC-6089, EC-6100, EC-6259, EC-6029, EC-7033, EC-7074 et EC-7107 et très invasif (ratio d'invasion > 0,25%) pour LF82, EC-6362, EC-6097, EC-7101, EC-7103, et EC-7137. Ces données confirment qu'en tant que caractéristique phénotypique intrinsèque, les souches d'AIEC diffèrent dans leur caractère invasif.

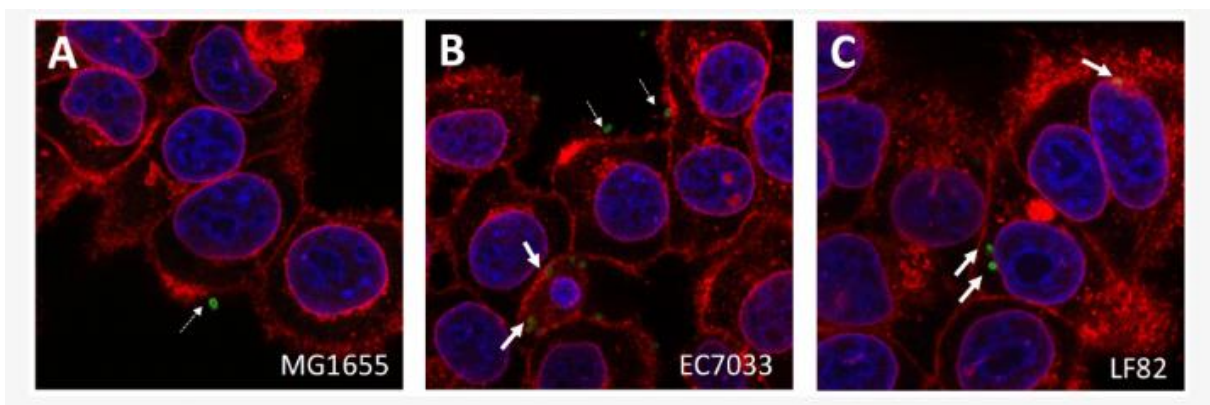


Figure 34. Microscopie confocale illustrant les rares événements de souches d'*E. coli* adhérant aux cellules (extracellulaires) et envahies par les cellules (intracellulaires) sur les cellules I-407 après une incubation de 3 h et des lavages approfondis. (A) : MG1655 non invasif (B) : EC.7033 AIEC. (C) : LF82 AIEC. Les bactéries extracellulaires (flèches pointillées) et intracellulaires (flèches grasses) sont identifiées par détection immunitaire (vert) ; Les cellules épithéliales sont contrastées par les noyaux marqués DAPI (bleu) et les membranes marquées WGA (rouge) (voir méthodes). Grossissement d'origine $\times 63$.

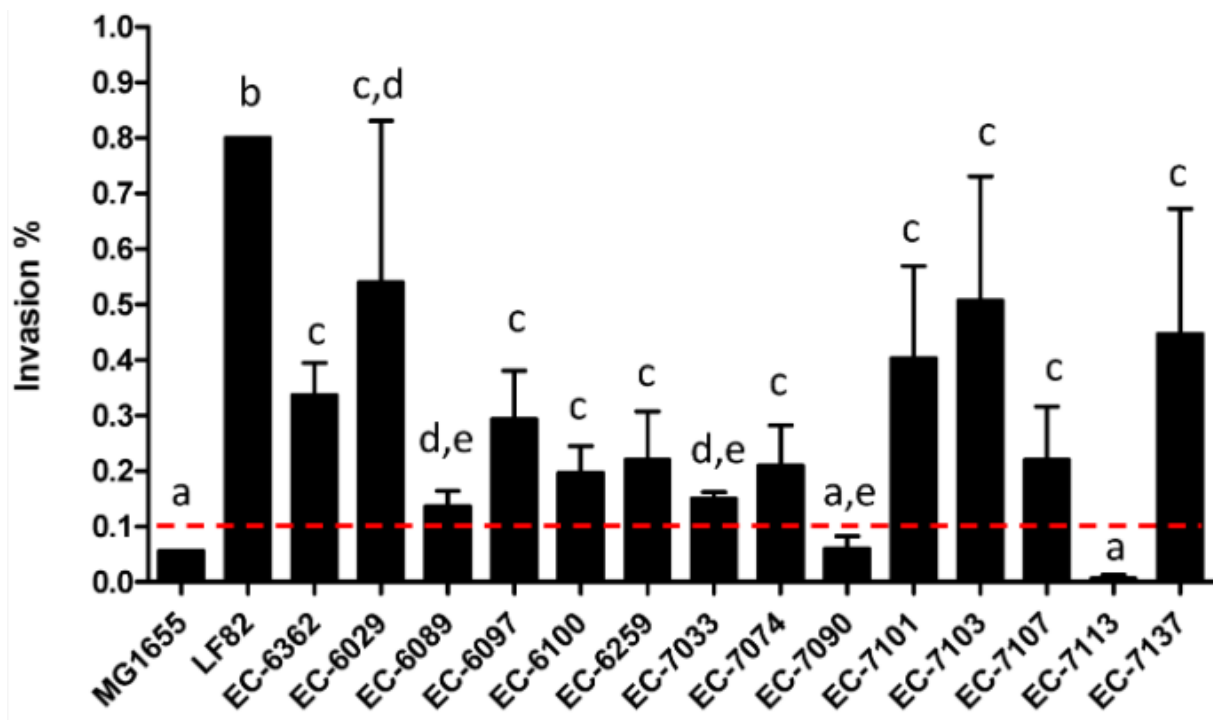


Figure 35. Souches d'*E. coli* ($n = 16$) différentes dans leur capacité à envahir les cellules I-407. Le ratio d'invasion (le nombre d'*E. coli* intracellulaires divisé par le nombre total d'*E. coli* dans l'inoculum initial à une MOI de 10) après une incubation de 3 h et un traitement de 1 h à la gentamicine a été multiplié par 100 et donc exprimé en un pourcentage. Les souches avec un indice d'invasion $\geq 0,1$ % (le seuil indiqué par une ligne pointillée) sont classées comme AIEC. Les données sont exprimées en tant que moyenne \pm écart-type à partir de trois déterminations. Les différentes lettres indiquent des différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) entre les souches dans une analyse de variance à un facteur (le test U de Mann-Whitney).

4.4.3. Évaluation de la pathogénicité de l'AIEC chez *C.*

elegans

Afin d'atténuer le biais possible dû à l'exposition au FUdR dans l'essai de longévité, nous avons utilisé la souche PX627 de *C. elegans*. Chez PX627, le traitement à l'auxine limite la phase de développement de L1 à L4 (voir la section Matériels et Méthodes) et induit donc la stérilité. Nous avons évalué la survie lors de la croissance de trois souches d'*E. coli* non invasives ($n=3$), de sept souches modérément invasives et de six souches très invasives (Figure 36 A-P). La LT50 varie de 5 jours pour la souche EC-7113 non invasive à 8 jours pour la souche MG1655. Cependant, le taux d'invasion dans un essai de culture cellulaire *in vitro* n'était pas corrélé à la virulence dans l'essai de longévité de *C. elegans*. Par exemple, une souche modérément

invasive (EC-7074) avait une LT_{50} courte (5 jours), alors qu'une souche très invasive (EC-7103) avait une LT_{50} de 7 jours. Nos données ont confirmé que les isolats cliniques d'*E. coli* diffèrent dans leur impact sur la longévité de *C. elegans*. Certaines des souches très invasives ont allongé la durée de vie, et la corrélation entre le ratio d'invasion et la LT_{50} (évaluée par le coefficient de Pearson ($r^2=8,9 \times 10^{-6}$) et le coefficient de corrélation de rang non paramétrique de Spearman ($r_s=0,059$) n'était pas statistiquement significative (Figure 37). Par conséquent, le caractère envahissant de l'AIEC n'était clairement pas corrélé avec la durée de vie de *C. elegans*.

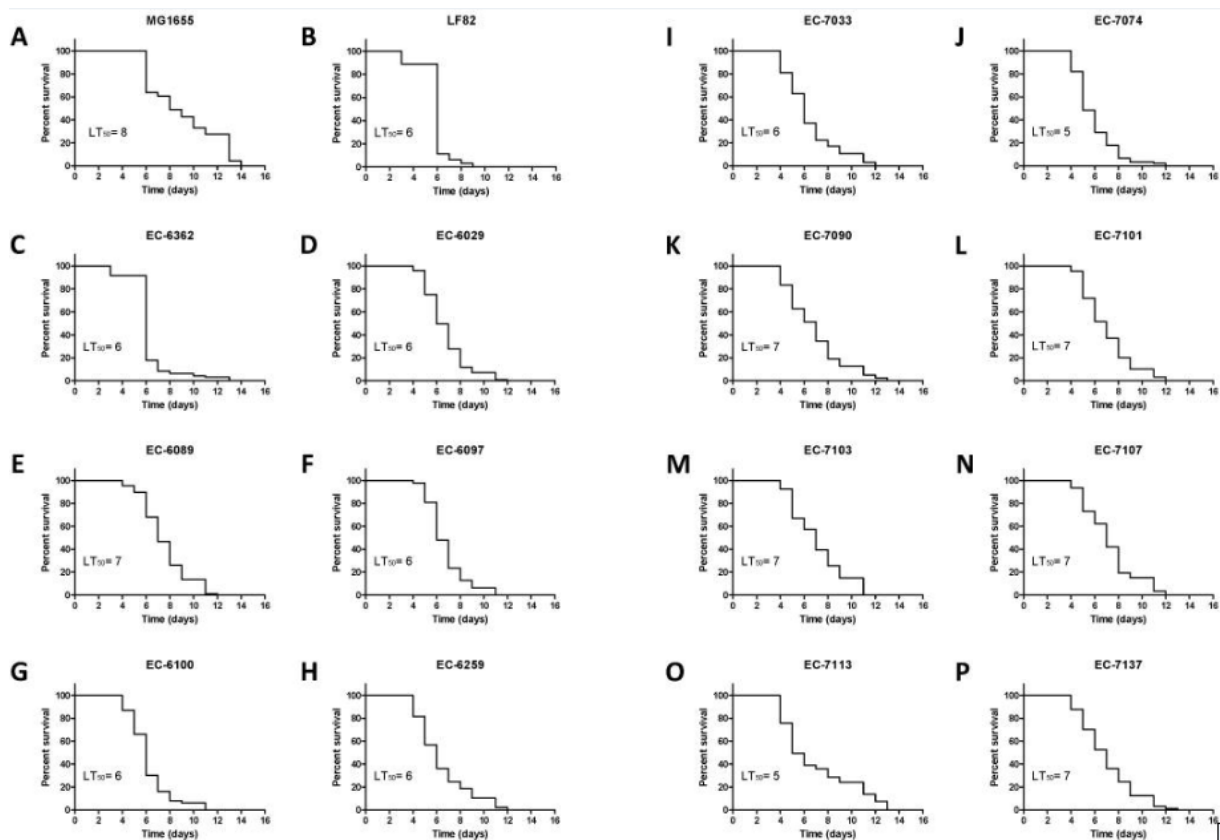


Figure 36. Courbes de survie de Kaplan – Meier à partir d'essais de destruction individuels pour *C. elegans* (PX627) infectés par 16 souches distinctes d'*E. coli*. Les valeurs « n » entre parenthèses correspondent au nombre initial de larves étudiées pour chaque souche bactérienne. Les jeunes adultes *C. elegans* ont été transférés sur des tapis bactériens (A) MG1655 (n = 94), (B) LF82 (n = 98), (C) EC-6362 (n = 96), (D) EC-6029 (n = 101), (E) EC-6089 (n = 88), (F) EC-6097 (n = 94), (G) EC-6100 (n = 100), (H) EC-6259 (n = 97), (I) EC-7033 (n = 94), (J) EC-7074 (n = 89), (K) EC-7090 (n = 78), (L) EC-7101 (n = 89), (M) EC-7103 (n = 94), (N) EC-7107 (n = 93), (O) EC-7113 (n = 99) et (P) EC-7137 (n = 97). La durée de vie médiane (LT_{50}) pour chaque souche évaluée est exprimée en jours.

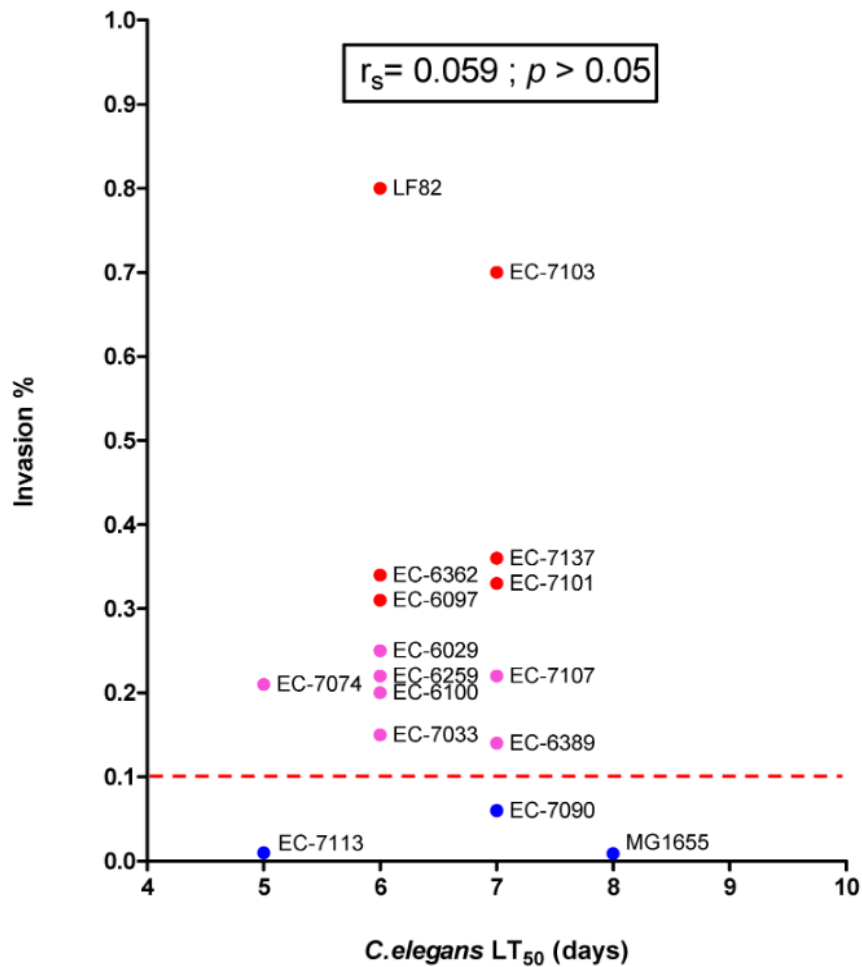


Figure 37. Absence d'association entre la durée de vie médiane (LT_{50}) de *C. elegans* infecté par *E. coli* et le taux d'invasion correspondant avec la lignée cellulaire épithéliale I-407, pour 16 souches distinctes d'*E. coli*. Les souches avec un indice d'invasion $\geq 0,1$ % (le seuil indiqué par une ligne pointillée) sont classées comme AIEC. La signification statistique de la corrélation a été évaluée en calculant le coefficient de régression de Pearson et le coefficient de corrélation de rang non paramétrique de Spearman r_s .

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'identification du pathotype AIEC reste toujours difficile; la plupart des techniques actuellement utilisées sont basées sur l'infection de lignées cellulaires (immortalisées) (Camprubí-Font *et al.*, 2018). Ces tests sont parfois limités par la perte de caractéristiques physiologiques clés des lignées cellulaires. Dans la littérature, ces bactéries sont caractérisées sur différentes lignées cellulaires épithéliales et macrophagiques, pour répondre à la définition phénotypique du pathovar, mais avec une reproductibilité imparfaite (Camprubí-Font & Martinez-Medina, 2020; Conte *et al.*, 2014; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Glasser *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2004; Martinez-Medina, Aldeguer, *et al.*, 2009; Negroni *et al.*, 2012; O'Brien *et al.*, 2017).

Face à ces contraintes et à l'absence de signature génétique des AIEC, de nouveaux modèles intégrés et/ou plus pertinents sont à l'étude. L'utilisation de cellules intestinales humaines dérivées des organoïdes du côlon d'un patient a approfondi notre compréhension de la physiopathologie des MII, de la variabilité interindividuelle et de la localisation précise des lésions dans l'intestin (Mayorgas *et al.*, 2021). Bien que le modèle organoïde offre de nombreux avantages, il reste long et coûteux et nécessite le consentement du patient pour accéder aux biopsies. S'ajoute à cela la variabilité biologique et la difficulté technique rendant difficile l'utilisation de ce modèle au criblage d'un grand nombre d'AIEC (Mayorgas *et al.*, 2021). Par ailleurs, une classification des AIEC basée sur les polymorphismes mononucléotidiques (SNP) a également été envisagée (Camprubí-Font *et al.*, 2018). Toutefois, une étude de l'algorithme proposé sur un ensemble de souches plus élevé ($n = 184$ versus $n = 50$) ne permettait pas une distinction précise des AIEC et non AIEC (Camprubí-Font *et al.*, 2020).

Les modèles animaux précliniques (par exemple, tels que l'inflammation induite chimiquement chez les rongeurs (Carvalho *et al.*, 2008; Chokr *et al.*, 2021; Drouet *et al.*, 2012) ou les souris transgéniques sensibles (Carvalho *et al.*, 2008) sont utiles pour identifier les effets pathogènes spécifiques de l'AIEC sur l'hôte (tels que l'induction de la fibrose et l'autophagie (Dalmasso *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2014), ou mettant en évidence le rôle du microenvironnement (Elhenawy *et al.*, 2021; Viennois *et al.*, 2020) et des facteurs de virulence bactérienne (Gibold *et al.*, 2016; Vazeille *et al.*, 2016). Cependant, ces modèles animaux ne sont pas pratiques pour un criblage approfondi d'un grand nombre de souches ni pour des approches thérapeutiques étendues (Palmela *et al.*, 2018).

Dans le cadre de notre travail, nous proposons deux modèles d'études des AIEC au travers d'une approche *in vitro* (HCS) et une approche *in vivo* (*C. elegans*).

5.1. CARACTÉRISATIONS PHÉNOTYPIQUE ET GÉNOTYPIQUE DES SOUCHES *E. COLI*

L'objectif de notre travail était la mise au point d'une technique innovante par imagerie, fiable et reproductible, permettant la caractérisation invasive simultanée d'un grand nombre de souches sur différentes lignées cellulaires. Cette mise au point s'est appuyée sur la caractérisation phénotypique et génotypique de la collection clinique (n = 40) et la collection ECOR (n = 70). Dans le but de sensibiliser l'identification des AIEC, deux lignées cellulaires épithéliales intestinales ont été utilisées pour définir l'invasion des souches étudiées. Conformément à ce qui a été démontré précédemment avec le score d'invasion d'AIEC LF82 (Conte *et al.*, 2014; O'Brien *et al.*, 2017), une disparité significative du score d'invasion réside entre la lignée cellulaire I-407 et Caco-2/TC-7, témoignant de la permissivité accrue de la lignée cellulaire Caco-2/TC-7 (*p-value* < 0,001). S'ajoute à cela l'identification de souches cytotoxiques et/ou résistantes à la gentamicine (n = 11 pour la lignée I-407 et n = 12 pour la lignée Caco-2/TC-7). En excluant ces souches, 29 % des souches étudiées étaient des AIEC.

Les biofilms assurent une résistance à diverses agressions physicochimiques dont une résistance aux antibiotiques (Lebeaux *et al.*, 2014). Dans le but d'évaluer si la capacité d'une souche à former du biofilm était corrélée à l'invasion ou à la survie, une approche comparative a été réalisée. Pour la collection étudiée (n = 112), 24 % des souches étaient associées à une production faible de biofilm, 47 % des souches associées à une production modérée de biofilm et 29 % des souches affiliées à une production forte de biofilm. La formation de biofilm n'était pas corrélée au pouvoir invasif des souches. Sur les cellules I-407, 75 % des souches non invasives (37 % sur cellules Caco-2/TC-7) étaient associées à une production de biofilm modérée ou forte. Ces résultats vont à l'encontre de l'étude menée sur une collection d'*E. coli*, démontrée par une corrélation entre une invasion avérée et un indice de formation de biofilm élevé (Martinez-Medina, *et al.*, 2009). Cette disparité pourrait provenir d'une différence de prévalence d'AIEC (42 % des souches étaient AIEC, n_{Total} = 65). En vue de confirmer cette hypothèse, une durée similaire au test d'invasion a été retenue pour la mesure de l'IFB. Étonnamment, la formation de biofilm n'était pas corrélée à l'invasivité des souches (I407 : *p-value* = 0,65 ; Caco-2/TC-7 : *p-value* = 0,27). La formation de biofilm sur 48 h ou 3

h n'a pas été corrélée à la survie et à la réplication intramacrophagique des souches (48 heures : $p - value = 0,51$; 3 heures : $p - value = 0,65$). Une distinction supplémentaire entre les souches capables de survivre et les souches capables de se répliquer n'était pas corrélée à la formation de biofilm (48 heures : $p - value = 0,36$; 3 heures : $p - value = 0,12$). De fait, la capacité de formation de biofilm sur 3 heures ou 48 heures ne peut être corrélée ni à l'invasion, ni à la survie ou à la réplication intracellulaire. Une des hypothèses pourrait provenir d'une résistance amoindrie à la gentamicine par la formation de biofilm produit par les *E. coli* (Al-Marri *et al.*, 2021; Qian *et al.*, 2022). Annexe à l'invasion et à la survie intracellulaire, la formation de biofilm pourrait être une stratégie supplémentaire des AIEC sur leur survie comme démontré par plusieurs études (Chassaing & Darfeuille-Michaud, 2013; Fanelli *et al.*, 2023; Martinez-Medina, Naves, *et al.*, 2009; Prudent *et al.*, 2021). Parmi les hypothèses énoncées, la formation de biofilm assurerait une protection face aux traitements antibiotiques et un réservoir non négligeable des AIEC au sein des macrophages (Prudent *et al.*, 2021). En faveur de cet argument, une récente étude a démontré une présence significative d'AIEC dans l'iléon, associée à une augmentation du risque de récurrence post-opératoire (Buisson *et al.*, 2023). Face à ces données, il pourrait être intéressant d'évaluer la capacité des *E. coli* identifiées comme AIEC à former des communautés bactériennes intracellulaires.

5.2. CARACTÉRISATION DE L'INVASIVITÉ DES SOUCHES PAR HCS

Parallèlement à la définition phénotypique de notre collection bactérienne, une approche par imagerie à haut contenu a été mise au point pour définir les souches invasives et souches non invasives décrites. Face aux difficultés et disparités d'identification des AIEC, l'intérêt était de proposer une nouvelle technique permettant une caractérisation d'un grand nombre de souches sur diverses lignées cellulaires. Ainsi, l'HCS offre les atouts de la reproductibilité et de la répétabilité associées au processus d'automatisation. Celle-ci s'applique lors des étapes de dépôts cellulaires, bactériens et des lavages. L'automatisation implique également les étapes d'acquisition (microscope InCell 6000) et d'analyse d'image (logiciel Columbus™). À l'heure actuelle, l'acquisition de 9 images par puits nous permet d'avoir des données suffisamment représentatives. L'analyse et le traitement des images à l'aide du logiciel Columbus™ impliquant un paramétrage précis (détection automatisée des

noyaux cellulaires, délimitation du contour cytoplasmique, repérage des bactéries intracellulaires immunomarquées) nous permettent de visualiser et différencier les cellules infectées et non infectées (Song *et al.*, 2017).

Pour ces raisons, la mise au point de la technique (la densité cellulaire, les paramètres de fluorescence, la multiplicité d'infection et le script analytique) a été éprouvée sur les deux lignées cellulaires (I-407, n = 112 ; Caco-2/TC-7, n = 65). La prévalence des souches invasives sur la lignée I-407 était de 35 %. Parmi les données collectées, une valeur seuil de 15 % de cellules infectées a permis de corréliser les souches positives (supérieur ou égal à 15 % de cellules infectées) aux souches invasives et les souches négatives (inférieur à 15 % de cellules infectées) (MOI 10, *** : p -value = 0,0002 ; MOI 50, ** : p -value = 0,0018). En s'appuyant sur cette valeur seuil, la performance du test évaluée présentait une spécificité (Sp) et une sensibilité (Se) similaire pour la MOI 10 (Sp = 69 % ; Se = 70 %). Toutefois, une spécificité moindre et de fait une sensibilité plus élevée était observée pour la MOI 50 (Sp = 57 % ; Se = 74 %). Ces valeurs sont en accord avec une valeur prédictive négative (MOI 10 : 81 % ; MOI 50 : 77 %) et une valeur prédictive positive (MOI 10 : 55 % ; MOI 50 : 54 %) moindre. Toutefois, pour l'applicabilité du test et pour la détection des souches invasives, une valeur prédictive positive plus élevée est attendue associée à une spécificité plus élevée.

La valeur seuil de 15 % a été également appliquée pour distinguer les souches positives des souches négatives pour la lignée Caco-2/TC-7 (MOI 10, * p -value = 0,013 ; MOI 50, ** p -value = 0,0098). Comparativement au test sur la lignée cellulaire I-407, l'étude de la performance du test a relevé une sensibilité moindre pour la MOI 10 (Se = 55 %) contrebalancée par une spécificité plus élevée (Sp = 75 %). Une sensibilité plus élevée pour la MOI 50 (Se = 66 %) et une spécificité moindre (Sp = 67 %) étaient observées. L'application du script sur la lignée Caco-2/TC-7 a permis d'obtenir une valeur prédictive positive plus élevée pour les deux MOI (MOI 10 : VPP = 64 % ; MOI 50 : VPP = 62 %) permettant une affirmation plus prononcée des souches invasives. A ce stade, l'application du script analytique sur la lignée Caco-2/TC-7 semble être le test le plus stringent, en faveur de l'identification des souches invasives.

En revanche, une nuance est apportée quant à la prévalence des souches invasives sur la lignée I-407 (35 %) influençant ainsi la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative. Avec une prévalence de 45 % de souches invasives, la lignée Caco-2/TC-7 pourrait avoir une valeur prédictive positive plus élevée. En vue d'affirmer le caractère invasif d'une souche, une approche tenant compte de l'association de plusieurs données (comme le ratio ABI/ACI, le ratio ABI/ACS) est en cours afin de spécifier davantage le test et exploiter tout le « haut contenu » de cet outil d'imagerie.

5.3. CARACTÉRISATION DES AIEC À L'AIDE DU NÉMATODE *C. elegans*

En tant qu'hôte simple qui se multiplie rapidement, *C. elegans* est devenu un modèle animal robuste pour étudier la pathogénèse microbienne (Sánchez-Diener *et al.*, 2017; Sifri *et al.*, 2005) et les effets bénéfiques de certaines bactéries (Poupet *et al.*, 2020). Dans la littérature scientifique, il existe quelques études sur la virulence d'un petit nombre de souches d'une même espèce bactérienne. La spécificité de la souche a été clairement liée aux niveaux de virulence pour *Staphylococcus aureus* à Gram positif (Sotto *et al.*, 2008) et *Pseudomonas aeruginosa* à Gram négatif et *Klebsiella pneumoniae* (Scott *et al.*, 2019). Fait intéressant, les souches les plus pathogènes n'ont pas montré le plus haut niveau de colonisation. Concernant *E. coli*, la plupart des études concernaient des souches pathovars entérohémorragiques, entéro-pathogènes et entérotoxinogènes qui tuent *C. elegans* en quelques heures (Anyanful *et al.*, 2005). En revanche, les bactéries commensales (y compris les pathobiontes dépourvus de gènes déterminants invasifs connus) ont été rarement étudiées. Simonsen *et al.*, (Simonsen *et al.*, 2011) ont montré que l'AIEC LF82 vivant (mais pas ses homologues tués par la chaleur) raccourcissait considérablement la durée de vie de *C. elegans*, par rapport à la souche OP50. De plus, plusieurs mutants LF82 se sont avérés atténués dans le test de destruction, ce qui suggère que plusieurs *E. coli* les gènes étaient associés à une perte de tolérance et à la mortalité (Simonsen *et al.*, 2011). Dans une étude de la souche MG1655 K-12 (sans l'antigène O), les dérivés recombinants produisant divers antigènes O étaient considérablement plus virulents dans le test de durée de vie (Browning *et al.*, 2013). De plus, la souche commensale *E. coli* HS a tué *C. elegans* aussi efficacement qu'une souche entéroagrégate ou que les souches produisant l'antigène O (Rasko *et al.*, 2008). Les

résultats suggèrent que ni le statut commensal *versus* pathogène ni l'origine d'une souche ne prédit avec précision l'effet sur la durée de vie de *C. elegans*. Il en est de même pour le phénotype de résistance aux antibiotiques comme en témoignent les résultats des tests d'infection avec divers producteurs de β -lactamase à spectre étendu bien caractérisés. Les isolats d'*E. coli* et d'*E. coli* sensibles aux β -lactamines ont indiqué que la capacité de tuer *C. elegans* était corrélée à la présence de facteurs de virulence et que les isolats producteurs de CTX-M avaient un impact relativement faible sur le nématode (Lavigne *et al.*, 2006). Pour ce qui est des souches pathogènes extra-intestinales, l'étude de Schifano *et al.*, sur les UPEC de différents phylogroupes a montré que la capacité d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales n'était pas corrélée à une durée de vie plus courte ni à la colonisation intestinale dans le modèle de nématode, bien que la pathogénicité soit plus étroitement liée au niveau de stress oxydatif (Schifano *et al.*, 2018). Nos résultats actuels sont en accord avec les données de la littérature, puisque les souches AIEC sont similaires aux *E. coli* pathogènes extra-intestinaux et les souches UPEC en ce qui concerne leur capacité à adhérer et à envahir les cellules hôtes (Antão *et al.*, 2009; Conte *et al.*, 2016).

Dans l'ensemble, les réponses du ver aux infections bactériennes pourraient en partie être influencées par (i) la souche de *C. elegans* utilisée et (ii) la méthode pour induire la stérilité et empêcher la progéniture survenant au cours de l'essai. Par exemple, le LT_{50} médié par OP50 a été déterminé à 6 jours ou 10 jours dans deux études utilisant la souche Bristol N2 sur des plaques FUdR ou un transfert quotidien sur de nouvelles plaques, respectivement (Browning *et al.*, 2013; Kim & Moon, 2019). Cependant, la LT_{50} médiée par OP50 était de 12 à 14 jours dans des expériences avec le mutant SS104 sensible à la température (25 ° C) de *C. elegans* (Simonsen *et al.*, 2011). Ici, nous avons confirmé que la durée de vie des vers PX627 était plus courte avec le prototype LF82 AIEC qu'avec OP50 (Simonsen *et al.*, 2011). L'utilisation de la souche PX627 de *C. elegans* nous a permis d'éviter un traitement stérilisant au FUdR, un composé qui pourrait affecter le ver et la bactérie. En effet, le FUdR a des propriétés antinéoplasiques et pourrait inhiber l'invasion cellulaire par l'AIEC, comme cela a été démontré pour le médicament analogue 6-mercaptopurine (Migliore *et al.*, 2018).

Comme mentionné ci-dessus, l'adhérence et le caractère invasif des souches AIEC sont évalués avec des cellules épithéliales humaines. Cependant, ces propriétés dépendent de la lignée cellulaire. Des variations du taux d'invasion et de la survie à l'intérieur des macrophages

ont également été rapportées (Ohno *et al.*, 2020; Tawfik *et al.*, 2019). De plus, le caractère invasif d'une souche donnée est également influencé par des paramètres environnementaux tels que le milieu de culture (Aygün *et al.*, 2018), les catabolites bactériens (Agus *et al.*, 2021), les métabolites bactériens (par exemple, le propionate et les acides gras à chaîne courte (Ormsby *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020), d'autres molécules dérivées de l'hôte (par exemple, la lactoferrine (Lepanto *et al.*, 2019), et les émulsifiants présents dans les aliments (Nickerson et McDonald, 2012; Viennois *et al.*, 2020). Pris dans leur ensemble, des déterminants variables et potentiellement inconnus du statut et de la virulence de l'AIEC pourraient expliquer la nature incohérente de l'interaction de l'AIEC avec les lignées cellulaires et l'absence de corrélation avec la durée de vie de *C. elegans*. Une autre limitation est liée à la température d'incubation du modèle d'invertébrés *C. elegans* (25 ° C), qui diffère nettement de la température corporelle de l'hôte (humain).

En conclusion, le caractère invasif intrinsèque de l'AIEC avec la lignée cellulaire épithéliale intestinale (c'est-à-dire le fait pour une souche individuelle d'être caractérisée comme invasive ou non ainsi que l'intensité de l'invasion, établie en % à partir de l'inoculum infectieux), n'était pas corrélé avec la durée de vie de *C. elegans*. À condition que la durée de vie du ver soit faible lorsqu'il est incubé avec certaines souches AIEC (telles que LF82), ce modèle pourrait néanmoins être utilisé pour dépister des médicaments ou des souches anti-invasives de type probiotique pour leur capacité à augmenter/restaurer la longévité chez *C. elegans*. Cette stratégie pourrait être utilisée pour cibler des clones AIEC spécifiques via la concurrence (Anyanful *et al.*, 2005, 2009; Ikeda *et al.*, 2007; JebaMercy et Balamurugan, 2012; Kim et Moon, 2019) ou *via* des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes plus générales (Martorell *et al.*, 2021). En effet, l'inoculation avec certaines bactéries probiotiques (y compris des souches de *Propionibacterium freundenreichii*, des *Bifidobacterium spp.* et de nombreux *Lactobacillus spp.*) est associée à une plus grande survie de *C. elegans* d'une manière spécifique à la souche (Kwon *et al.*, 2016; Poupet *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2019). Fait intéressant, les bactéries aux propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes intrinsèques ont prolongé la durée de vie de *C. elegans* et ont également pu soulager la colite chez la souris (Grompone *et al.*, 2012).

CONCLUSION GENERALE

L'ensemble des travaux s'est axé sur la caractérisation des *E. coli* sur leur pouvoir invasif, leur capacité à survivre au sein des macrophages, la production de biofilm et l'identification de gènes de virulence. Bien que la formation de biofilm soit un avantage certain pour les souches, aucune corrélation n'a été rapportée avec le pouvoir invasif ou de survie des souches. La caractérisation phénotypique et génotypique a également permis l'identification des AIEC sur la collection ECOR et la collection clinique. Plus spécifiquement, l'étude des *E. coli* a confirmé une variabilité du pouvoir invasif des souches suivant les lignées cellulaires utilisées. Ces résultats entérinent la nécessité de développer une méthode universelle d'identification des AIEC en vue de sensibiliser et spécifier au mieux le test d'identification. Notre stratégie a été de proposer une méthodologie innovante, s'appuyant sur l'imagerie et l'automatisation pour caractériser davantage le pouvoir invasif. Bien que les résultats soient encourageants, des ajustements sont encore nécessaires pour atteindre une performance du test s'approchant de la technique *gold standard*. Il n'est pas exclu que les données apportées par l'imagerie à haut contenu pourraient fournir des informations supplémentaires quant au phénotype adhérent et invasif de la souche par des marquages complémentaires (ex : récepteurs, trafic intra-cellulaire). Des études complémentaires pour corrélérer ces données à un modèle *in vivo* pourraient être envisagées. Dans notre cas, le modèle *C. elegans* a été sélectionné pour les avantages qu'il offre pour un criblage de grand nombre de souches. Toutefois, malgré une survie altérée par l'infection des souches, aucune corrélation entre le pouvoir invasif et la survie du nématode a été identifiée. Néanmoins, la caractérisation par imagerie à haut contenu ou au travers de *C. elegans* pourrait offrir des perspectives dans la découverte de médicaments thérapeutiques ou probiotiques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agus, A., Richard, D., Fais, T., Vazeille, E., Chervy, M., Bonnin, V., Dalmaso, G., Denizot, J., Billard, E., Bonnet, R., Buisson, A., Barnich, N., & Delmas, J. (2021). Propionate catabolism by CD-associated adherent-invasive *E. coli* counteracts its anti-inflammatory effect. *Gut Microbes*, 13(1), 1-18. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1839318>
- Al-Marri, T., Al-Marri, A., Al-Zanbaqi, R., Al Ajmi, A., & Fayez, M. (2021). Multidrug resistance, biofilm formation, and virulence genes of *Escherichia coli* from backyard poultry farms. *Veterinary World*, 2869-2877. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2869-2877>
- Antão, E.-M., Wieler, L. H., & Ewers, C. (2009). Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathogens*, 1(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-1-22>
- Anyanful, A., Dolan-Livengood, J. M., Lewis, T., Sheth, S., DeZalia, M. N., Sherman, M. A., Kalman, L. V., Benian, G. M., & Kalman, D. (2005). Paralysis and killing of *Caenorhabditis elegans* by enteropathogenic *Escherichia coli* requires the bacterial tryptophanase gene. *Molecular Microbiology*, 57(4), 988-1007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04739.x>
- Anyanful, A., Easley, K. A., Benian, G. M., & Kalman, D. (2009). Conditioning protects *C. elegans* from lethal effects of enteropathogenic *E. coli* by activating genes that regulate lifespan and innate immunity. *Cell Host & Microbe*, 5(5), 450-462. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.012>
- Aygun, H., Karamese, M., Ozic, C., & Uyar, F. (2018). The effects of mucosal media on some pathogenic traits of Crohn's disease-associated *Escherichia coli* LF82. *Future Microbiology*, 13(2), 141-149. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0133>
- Browning, D. F., Wells, T. J., França, F. L. S., Morris, F. C., Sevastyanovich, Y. R., Bryant, J. A., Johnson, M. D., Lund, P. A., Cunningham, A. F., Hobman, J. L., May, R. C., Webber, M. A., & Henderson, I. R. (2013). Laboratory adapted *Escherichia coli* K-12 becomes a pathogen of *Caenorhabditis elegans* upon restoration of O antigen biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 87(5), 939-950. <https://doi.org/10.1111/mmi.12144>
- 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. (2023). Role of adherent and invasive *Escherichia coli* in Crohn's disease : Lessons from the postoperative recurrence model. *Gut*, 72(1), 39-48. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-325971>

- Camprubí-Font, C., Bustamante, P., Vidal, R. M., O'Brien, C. L., Barnich, N., & Martinez-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., & Martinez-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>
- Camprubí-Font, C., & Martinez-Medina, M. (2020). Why the discovery of adherent-invasive *Escherichia coli* molecular markers is so challenging? *World Journal of Biological Chemistry*, *11*(1), 1-13. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v11.i1.1>
- 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>
- Chassaing, B., & Darfeuille-Michaud, A. (2013). The σE Pathway Is Involved in Biofilm Formation by Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *195*(1), 76. <https://doi.org/10.1128/JB.01079-12>
- Chokr, D., Cornu, M., Neut, C., Bortolus, C., Charlet, R., Desreumaux, P., Specq, S., & Sendid, B. (2021). Adherent invasive *Escherichia coli* (AIEC) strain LF82, but not *Candida albicans*, plays a profibrogenic role in the intestine. *Gut Pathogens*, *13*(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13099-021-00401-z>
- Conte, M. P., Aleandri, M., Marazzato, M., Conte, A. L., Ambrosi, C., Nicoletti, M., Zagaglia, C., Gambarà, G., Palombi, F., De Cesaris, P., Ziparo, E., Palamara, A. T., Riccioli, A., & Longhi, C. (2016). The Adherent/Invasive *Escherichia coli* Strain LF82 Invades and Persists in Human Prostate Cell Line RWPE-1, Activating a Strong Inflammatory Response. *Infection and Immunity*, *84*(11), 3105-3113. <https://doi.org/10.1128/IAI.00438-16>
- Conte, M. P., Longhi, C., Marazzato, M., Conte, A. L., Aleandri, M., Lepanto, M. S., Zagaglia, C., Nicoletti, M., Aloï, M., Totino, V., Palamara, A. T., & Schippa, S. (2014). Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients : Phenotypic and genetic pathogenic features. *BMC Research Notes*, *7*, 748. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-748>

- Dalmaso, G., Nguyen, H. T. T., Faïs, T., Massier, S., Barnich, N., Delmas, J., & Bonnet, R. (2019). Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Manipulate Host Autophagy by Impairing SUMOylation. *Cells*, *8*(1), 35. <https://doi.org/10.3390/cells8010035>
- 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)
- Drouet, M., Vignal, C., Singer, E., Djouina, M., Dubreuil, L., Cortot, A., Desreumaux, P., & Neut, C. (2012). AIEC colonization and pathogenicity : Influence of previous antibiotic treatment and preexisting inflammation. *Inflammatory Bowel Diseases*, *18*(10), 1923-1931. <https://doi.org/10.1002/ibd.22908>
- Elhenawy, W., Hordienko, S., Gould, S., Oberc, A. M., Tsai, C. N., Hubbard, T. P., Waldor, M. K., & Coombes, B. K. (2021). High-throughput fitness screening and transcriptomics identify a role for a type IV secretion system in the pathogenesis of Crohn's disease-associated *Escherichia coli*. *Nature Communications*, *12*(1), 2032. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22306-w>
- Fanelli, G., Pasqua, M., Prosseda, G., Grossi, M., & Colonna, B. (2023). AcrAB efflux pump impacts on the survival of adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 inside macrophages. *Scientific Reports*, *13*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29817-0>
- Gibold, L., Garenaux, E., Dalmaso, 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>
- 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>
- Grompone, G., Martorell, P., Llopis, S., González, N., Genovés, S., Mulet, A. P., Fernández-Calero, T., Tiscornia, I., Bollati-Fogolín, M., Chambaud, I., Foligné, B., Montserrat, A., & Ramón, D. (2012). Anti-inflammatory *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 strain protects against oxidative

- stress and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, 7(12), e52493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052493>
- Ikeda, T., Yasui, C., Hoshino, K., Arikawa, K., & Nishikawa, Y. (2007). Influence of lactic acid bacteria on longevity of *Caenorhabditis elegans* and host defense against *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6404-6409. <https://doi.org/10.1128/AEM.00704-07>
- JebaMercy, G., & Balamurugan, K. (2012). Effects of sequential infections of *Caenorhabditis elegans* with *Staphylococcus aureus* and *Proteus mirabilis*. *Microbiology and Immunology*, 56(12), 825-835. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2012.00509.x>
- Kim, J., & Moon, Y. (2019). Worm-Based Alternate Assessment of Probiotic Intervention against Gut Barrier Infection. *Nutrients*, 11(9), 2146. <https://doi.org/10.3390/nu11092146>
- Kwon, G., Lee, J., & Lim, Y.-H. (2016). Dairy *Propionibacterium* extends the mean lifespan of *Caenorhabditis elegans* via activation of the innate immune system. *Scientific Reports*, 6, 31713. <https://doi.org/10.1038/srep31713>
- Lavigne, J.-P., Blanc-Potard, A.-B., Bourg, G., O'Callaghan, D., & Sotto, A. (2006). *Caenorhabditis elegans* : Modèle d'étude *in vivo* de la virulence bactérienne. *Pathologie Biologie*, 54(8-9), 439-446. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2006.07.011>
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., & Beloin, C. (2014). Biofilm-Related Infections : Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 78(3), 510-543. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14>
- Lepanto, M., Rosa, L., Cutone, A., Scotti, M., Conte, A., Marazzato, M., Zagaglia, C., Longhi, C., Berlutti, F., Musci, G., Valenti, P., & Conte, M. (2019). Bovine Lactoferrin Pre-Treatment Induces Intracellular Killing of AIEC LF82 and Reduces Bacteria-Induced DNA Damage in Differentiated Human Enterocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20225666>
- Martin, H. M., Campbell, B. J., Hart, C. A., Mpofo, C., Nayar, M., Singh, R., Englyst, H., Williams, H. F., & Rhodes, J. M. (2004). Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology*, 127(1), 80-93. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.03.054>

- 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., Naves, P., Blanco, J., Aldeguer, X., Blanco, J. E., Blanco, M., Ponte, C., Soriano, F., Darfeuille-Michaud, A., & Garcia-Gil, L. J. (2009). Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). *BMC Microbiology*, *9*(1), 202. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-202>
- Martorell, P., Alvarez, B., Llopis, S., Navarro, V., Ortiz, P., Gonzalez, N., Balaguer, F., Rojas, A., Chenoll, E., Ramón, D., & Tortajada, M. (2021). Heat-Treated *Bifidobacterium longum* CECT-7347 : A Whole-Cell Postbiotic with Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Gut-Barrier Protection Properties. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *10*(4), 536. <https://doi.org/10.3390/antiox10040536>
- Mayorgas, A., Dotti, I., Martínez-Picola, M., Esteller, M., Bonet-Rossinyol, Q., Ricart, E., Salas, A., & Martínez-Medina, M. (2021). A Novel Strategy to Study the Invasive Capability of Adherent-Invasive *Escherichia coli* by Using Human Primary Organoid-Derived Epithelial Monolayers. *Frontiers in Immunology*, *12*, 914. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.646906>
- Migliore, F., Macchi, R., Landini, P., & Paroni, M. (2018). Phagocytosis and Epithelial Cell Invasion by Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Are Inhibited by the Anti-inflammatory Drug 6-Mercaptopurine. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 964. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00964>
- Negrone, A., Costanzo, M., Vitali, R., Superti, F., Bertuccini, L., Tinari, A., Minelli, F., Di Nardo, G., Nuti, F., Pierdomenico, M., Cucchiara, S., & Stronati, L. (2012). Characterization of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *18*(5), 913-924. <https://doi.org/10.1002/ibd.21899>
- 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., & 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>
- 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>
- 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., Roe, A. J., Hasson, C., Boyd, J., Fitzgerald, E., Gerasimidis, K., Morrison, D., Hold, G. L., Hansen, R., Walker, D., Wall, D. M. (2020). Propionic Acid Promotes the Virulent Phenotype of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Cell Reports*, 30(7), 2297-2305.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.078>
- 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>
- Poupet, C., Chassard, C., Nivoliez, A., & Bornes, S. (2020). *Caenorhabditis elegans*, a Host to Investigate the Probiotic Properties of Beneficial Microorganisms. *Frontiers in Nutrition*, 7, 135. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00135>
- Prudent, V., Demarre, G., Vazeille, E., Wery, M., Quenech'Du, N., Ravet, A., Dauverd - Girault, J., van Dijk, E., Bringer, M.-A., Describes, M., Barnich, N., Rimsky, S., Morillon, A., & Espéli, O. (2021). The Crohn's disease-related bacterial strain LF82 assembles biofilm-like communities to protect itself from phagolysosomal attack. *Communications Biology*, 4(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02161-7>
- Qian, W., Li, X., Yang, M., Liu, C., Kong, Y., Li, Y., Wang, T., & Zhang, Q. (2022). Relationship Between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Ningbo, China. *Infection and Drug Resistance*, 15, 2865-2878. <https://doi.org/10.2147/IDR.S363652>
- Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Myers, G. S. A., Mongodin, E. F., Fricke, W. F., Gajer, P., Crabtree, J., Sebahia, M., Thomson, N. R., Chaudhuri, R., Henderson, I. R., Sperandio, V., & Ravel, J. (2008). The Pangenome Structure of *Escherichia coli*: Comparative Genomic Analysis of *E. coli*

- Commensal and Pathogenic Isolates. *Journal of Bacteriology*, 190(20), 6881-6893. <https://doi.org/10.1128/JB.00619-08>
- Sánchez-Diener, I., Zamorano, L., López-Causapé, C., Cabot, G., Mulet, X., Peña, C., Del Campo, R., Cantón, R., Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Arcos, S. C., Navas, A., & Oliver, A. (2017). Interplay among Resistance Profiles, High-Risk Clones, and Virulence in the *Caenorhabditis elegans* *Pseudomonas aeruginosa* Infection Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(12), e01586-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01586-17>
- Schifano, E., Marazzato, M., Ammendolia, M. G., Zanni, E., Ricci, M., Comanducci, A., Goldoni, P., Conte, M. P., Uccelletti, D., & Longhi, C. (2018). Virulence behavior of uropathogenic *Escherichia coli* strains in the host model *Caenorhabditis elegans*. *MicrobiologyOpen*, 8(6), e00756. <https://doi.org/10.1002/mbo3.756>
- Scott, E., Holden-Dye, L., O'Connor, V., & Wand, M. E. (2019). Intra Strain Variation of the Effects of Gram-Negative ESKAPE Pathogens on Intestinal Colonization, Host Viability, and Host Response in the Model Organism *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3113. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03113>
- Sharma, K., Pooranachithra, M., Balamurugan, K., & Goel, G. (2019). Probiotic mediated colonization resistance against *E. coli* infection in experimentally challenged *Caenorhabditis elegans*. *Microbial Pathogenesis*, 127, 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.041>
- Sifri, C. D., Begun, J., & Ausubel, F. M. (2005). The worm has turned—Microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Microbiology*, 13(3), 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.01.003>
- 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>
- Song, O.-R., Deboosere, N., Delorme, V., Queval, C. J., Deloison, G., Werkmeister, E., Lafont, F., Baulard, A., Iantomasi, R., & Brodin, P. (2017). Phenotypic assays for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Cytometry Part A*, 91(10), 983-994. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23129>
- Sotto, A., Lina, G., Richard, J.-L., Combescure, C., Bourg, G., Vidal, L., Jourdan, N., Etienne, J., & Lavigne, J.-P. (2008). Virulence potential of *Staphylococcus aureus* strains isolated from diabetic foot

ulcers : A new paradigm. *Diabetes Care*, 31(12), 2318-2324. <https://doi.org/10.2337/dc08-1010>

Vazeille, E., Chassaing, B., Buisson, A., Dubois, A., de Vallée, A., Billard, E., Neut, C., Bommelaer, G., Colombel, J.-F., Barnich, N., Darfeuille-Michaud, A., & Bringer, M.-A. (2016). GipA Factor Supports Colonization of Peyer's Patches by Crohn's Disease-associated *Escherichia Coli*. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22(1), 68-81. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000609>

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>

Zhang, S., Dogan, B., Guo, C., Herlekar, D., Stewart, K., Scherl, E. J., & Simpson, K. W. (2020). Short Chain Fatty Acids Modulate the Growth and Virulence of Pathosymbiont *Escherichia coli* and Host Response. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(8), 462. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080462>

ANNEXE

Résumé de l'article. Le nématode *Caenorhabditis elegans* est un ver plat qui permet d'étudier les interactions hôte - bactéries en suivant sa longévité. Nous avons utilisé cet organisme multicellulaire comme modèle pour évaluer l'impact de différentes souches de *E. coli* non invasives ou de souches de différents niveaux de virulence, isolées de patients atteints de maladie de Crohn. Si nous avons clairement montré que les souches invasives affectaient davantage la survie des vers par rapport à des souches contrôles, non invasives, il n'a pas été possible de mettre en évidence de corrélation entre l'intensité de l'invasion sur cellules épithéliales et la longévité atténuée du ver. Quoi qu'il en soit, ce travail montre qu'il est possible d'utiliser le ver *C. elegans* pour mimer une infection à AIEC. Ce modèle pourrait être utilisé pour évaluer des molécules anti-adhésions ou encore des souches de bactéries probiotiques ciblées sur un clone particulier d'AIEC. Un tel criblage présente l'intérêt d'être alternatif à l'expérimentation animale.



Article

Adherent-Invasive and Non-Invasive *Escherichia coli* Isolates Differ in Their Effects on *Caenorhabditis elegans*' Lifespan

Maria Beatriz de Sousa Figueiredo ^{1,†}, Elizabeth Pradel ^{1,2,†}, Fanny George ¹, Séverine Mahieux ¹, Isabelle Houcke ¹, Muriel Pottier ¹, Chantal Fradin ³, Christel Neut ¹, Catherine Daniel ², Antonino Bongiovanni ⁴, Benoît Foligné ^{1,*}, and Marie Titécat ^{1,*}

¹ Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286-INFINITE-Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille, France; mariabeatriz.desousafigueiredo@univ-lille.fr (M.B.d.S.F.); elizabeth.pradel@inserm.fr (E.P.); fanny.george@univ-lille.fr (F.G.); severine.mahieux@univ-lille.fr (S.M.); isabelle.houcke@univ-lille.fr (I.H.); muriel.pottier@univ-lille.fr (M.P.); and christel.neut@univ-lille.fr (C.N.)

² Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR 9017-Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France; catherine.daniel@ibl.cnrs.fr (CD)

³ Univ. Lille, Inserm, Institut Pasteur de Lille, U1167-RID-AGE, F-59000 Lille, France; chantal.fradin@univ-lille.fr (C.F.)

⁴ Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US 41-UMS 2014-PLBS, F-59000 Lille, France; antonino.bongiovanni@univ-lille.fr (A.B.)

* Correspondence: benoit.foligne@univ-lille.fr (B.F.); marie.titecat@univ-lille.fr (M.T.)

† Equal contribution

Citation: de Sousa Figueiredo, M.B.; Pradel, E.; George, F.; Mahieux, S.; Houcke, I.; Pottier, M.; Fradin, C.; Neut, C.; Daniel, C.; Bongiovanni, A.; et al. Adherent-Invasive and Non-Invasive *Escherichia coli* Isolates Differ in Their Effects on *Caenorhabditis elegans*' Lifespan. *Microorganisms* **2021**, *9*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Charles M. Dozois

Received: 23 July 2021

Accepted: 24 August 2021

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) pathotype has been implicated in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases in general and in Crohn's disease (CD) in particular. AIEC strains are primarily characterized by their ability to adhere to and invade intestinal epithelial cells. However, the genetic and phenotypic features of AIEC isolates vary greatly as a function of the strain's clonality, host factors, and the gut microenvironment. It is thus essential to identify the determinants of AIEC pathogenicity and understand their role in intestinal epithelial barrier dysfunction and inflammation. We reasoned that soil nematode *Caenorhabditis elegans* (a simple but powerful model of host-bacterium interactions) could be used to study the virulence of AIEC vs. non-AIEC *E. coli* strains. Indeed, we found that the colonization of *C. elegans* (strain N2) by *E. coli* impacted survival in a strain-specific manner. Moreover, the AIEC strains' ability to invade cells in vitro was linked to the median lifespan in *C. elegans* (strain PX627). However, neither the *E. coli* intrinsic invasiveness (i.e., the fact for an individual strain to be characterized as invasive or not) nor AIEC's virulence levels (i.e., the intensity of invasion, established in % from the infectious inoculum) in intestinal epithelial cells was correlated with *C. elegans*' lifespan in the killing assay. Nevertheless, AIEC longevity of *C. elegans* might be a relevant model for screening anti-adhesion drugs and anti-invasive probiotics.

Keywords: adherent-invasive *E. coli* (AIEC); *Caenorhabditis elegans*; gut inflammation; inflammatory bowel disease (IBD); intestinal epithelial cell

1. Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBDs, including Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC)) are caused by intricate genetic and environmental factors that alter intestinal homeostasis [1,2]. This inflammatory contexts results in dysbiosis [3], which is characterized by specific changes in the symbiont/pathobiont ratio of the gut microbiota [4]. Along with a significant reduction in overall microbial diversity, microbial imbalance leads to a fall in the abundance of beneficial bacteria and an increase in the abundance of potentially pathogenic bacteria. The latter include certain mucosa-associated bacteria (such as the Enterobacterales [5]) that might trigger or exacerbate IBDs in susceptible individuals.

Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) was originally identified as a specific pathogenic group in patients with ileitis developed CD in France [6,7]. Over the past two decades, research has shown that the AIEC pathotype is involved in the pathogenesis of IBD [8]; these bacteria are overrepresented in mucosal samples from patients with CD (relative to healthy controls) [9]. AIEC have also been evidenced in inflammatory diseases in animal [10] and appear to have a role in experimental models of colitis [11,12]. Moreover, the high prevalence of AIEC strains in patients with UC and CD suggests that the bacterium's association with IBD in general is stronger than first anticipated [13,14]. AIEC are also abnormally abundant in individuals with colorectal cancer [15,16], patients with functional intestinal disorders, and asymptomatic people undergoing surveillance colonoscopy [17,18]. The significance of AIEC in healthy people (albeit at a lower frequency than in patients with IBDs) has yet to be determined; the presence of these strains might indicate a predysbiotic state (favoring infection), or an elevated risk of IBD, or other diseases involving a gut microbial imbalance. Surprisingly, the occurrence and abundance of intestinal AIECs in people with metabolic diseases and other immune disorders associated with low-grade inflammation have not been extensively studied. For example, it has not yet been determined whether AIECs are abnormally abundant in individuals with arthritis or whether the strains' abundance is linked to the aging process [19]. *E. coli* is a versatile bacterial species that encompasses probiotic strains with beneficial properties, harmless commensal strains, and pathogenic strains found in the gastrointestinal tract in humans and animals. In fact, AIEC pathobionts might belong to the "gray zone" of commensal bacteria with pro-inflammatory potential and a propensity to disrupt intestinal epithelial homeostasis. This disruption might lead to a state of chronic inflammation via continuous stimulation of the mucosal immune system. It is therefore essential to understand the determinants of the AIEC's pathogenicity within the host.

The AIEC phenotype is characterized by the ability to (i) adhere to and invade intestinal epithelial cells [6,20,21], (ii) survive and replicate within the macrophage phagolysosome, and (iii) trigger the release of pro-inflammatory cytokines. Otherwise, the AIECs are highly diverse in both genetic and phenotypic terms: new models tracking the within-host evolution of AIECs suggest that the strains stratify themselves into distinct subpopulations in vivo [22]. Depending on the host environment, the AIEC's virulent phenotype may exert distinct degrees of pathogenicity via various metabolic, immune, and virulence factors [8,12,23]. Many virulence genes and factors have been described in AIEC pathobionts, and comparative genomics studies have evidenced a high degree of variability (including single nucleotide polymorphisms). Hence, the genetic-based identification of AIEC is challenging (for a review, see [8]). Although most AIEC strains are assigned to the B2 phylogroup, others are assigned to the A, B1, and D phylogroups. Hence, no potential genetic markers nor immunoreactivity appear to be specific and distributed across all AIEC strains and might be predictive of the phenotype explaining the lack of molecular tools for their rapid identification [24,25].

Nevertheless, the AIEC's most important property is their ability to adhere to and invade mucosal cells [13]; an interaction with immune cells (and especially macrophages) is less frequent. Again, both these phenotypic features are heterogeneous and vary depending on both the strain's clonality and host determinants [26]. For a strain to be assigned as an AIEC, an in vitro assay with epithelial cells is used; at least 0.1% of the bacteria in the initial inoculum must enter the cells. However, this ratio depends strongly on the cell line used in the assay (e.g., Int-407 or Caco-2) [27]. Furthermore, different AIEC clones can show different levels of cell invasion in the same assay [12]. Although these in vitro assays can discriminate between AIEC strains and non-AIEC strains isolated from healthy individuals, patients with IBD, and patients with other pathologies, we reasoned that additional in vitro models are required to study AIEC virulence and characterize the bacteria's detrimental impact on intestinal homeostasis in the host.

The soil-living nematode worm *Caenorhabditis elegans* is a simple, powerful model of host-bacteria interactions. Many of its biological pathways are conserved in higher organisms [28], and *C. elegans* models have been used to study bacterial pathogenesis [29] and identify beneficial microorganisms [30]. The association between *C. elegans* and the bacteria found within the nematode is more than a simple predator–prey dietary relationship. In fact, several important features of *C. elegans*' innate immune system are conserved in vertebrates. Similarly, many of the virulence factors used by bacterial pathogens to cause disease in mammalian hosts are also crucial for pathogenesis in *C. elegans*. The *C. elegans* model has been used to study major human pathogens, including entero-invasive *Salmonella enterica* [31–33], certain enteropathogenic *E. coli* pathotypes [34–36], and uropathogenic *E. coli* (UPEC) [37] (which share features with AIEC [38]). To date, the LF82 prototype is the only AIEC strain to have been evaluated in the *C. elegans* infection model. When compared with the auxotrophic OP50 *E. coli* strain (*C. elegans*' usual food in the lab), exposure to live LF82 bacteria markedly reduced the nematode's median lifespan (LT₅₀) by nearly 50% [39]. In contrast, heat-killed bacteria had no impact on survival [39]. To the best of our knowledge, no other AIEC isolates (and especially clones covering the spectrum of virulence in epithelial cell cultures) have previously been assessed for their effect on *C. elegans* longevity. In the present study, we therefore thought to determine whether the characteristics of *C. elegans* infection by different AIEC clinical isolates were related to the strains' pathogenic potential.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

All chemicals and reagents were purchased from Sigma Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France), unless otherwise stated.

2.2. Bacterial Strains and Culture Conditions

The *E. coli* strains included reference strains known to be invasive (or not) and clinical isolates. The strains were cultured in Luria–Bertani (LB) medium at 30 °C or 37 °C, with shaking. The uracil auxotroph OP50 is the “gold-standard” control strain routinely used in *C. elegans* survival assays [40]. OP50 has a low metabolic rate, which limits bacterial proliferation within the gut and thus maximizes the worm's life span [41]. MG1655 is a prototype non-invasive, non-pathogenic, human-commensal-derived *E. coli* K-12 strain used as a model in bacterial genetics, molecular biology, and biotechnology [42]. *E. coli* Nissle 1917 (EcN, also known as DSM 6601 or Mutaflor) is a non-invasive, non-pathogenic, commensal strain originally isolated from the stools of a World War I soldier withstanding a severe shigellosis outbreak; the strain has many anti-infectious and anti-inflammatory probiotic properties [43,44]. The LF82 strain is the most extensively studied AIEC and is considered to be the reference strain for the association with CD [6]. Like LF82, strain EC-6362 was isolated from ileal lesions of patients with CD, and has strong invasive capacities [11]. NRG857c is also a prototype AIEC strain with additional intestinal profibrogenic traits [45,46]. The other strains used in the present study were human non-AIEC or AIEC isolates from the University of Lille's collection (Lille, France) [47,48]: EC-6029, EC-6089, EC-6097, EC-6100, EC-6259, EC-7033, EC-7074, EC-7090, EC-7101, EC-7103, EC-7033, EC-7107, EC-7113, and EC-7137. All patients had given their written, informed consent to the isolation of bacterial strains from their biopsies or stools. The collection's constitution had been approved by an institutional review board (references: CCPPRB Lille 1994 #94/01 and CCPPRB Lille 2000 #00/60). Of note, all bacterial strains were confirmed to be susceptible to gentamicin to ensure the appropriate use of this antimicrobial for invasion assays (data not shown).

2.3. *C. elegans* Strains, Culture Conditions, and Longevity Assays

The wild-type *C. elegans* Bristol N2 strain was provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center (Minneapolis, MN, USA). *C. elegans* strain PX627 [49] was obtained from the CGC (kindly via Jonathan Ewbank). Worms were maintained at 20 °C or 25 °C on nematode growth medium (NGM) agar with *E. coli* OP50 as a food source, using established procedures [40]. Infection assays were performed on NGM plates in triplicate at least. For each bacterial strain, more than 75 worms were used in the longevity assay.

To measure the lifespan of *C. elegans* N2, synchronized L1 larvae were grown at 20 °C until they reached the L4 stage. The worms were incubated at 25 °C on NGM plates containing 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR, 50 µM). and seeded with *E. coli* (OP50 as a control, or the other strains investigated here) with 10 µL (OD = 2.0) for each lawn and incubated at 25 °C. Live or dead worms were counted every 24 h; a worm was considered to be dead when it failed to respond to a gentle touch with a worm picker. Worms that crawled off the plates or died from non-natural causes (such as bagging or adherence to the wall of the plate) were censored. All longevity assays were performed in triplicate at least with 25–35 worms per plate; hence, between 75 and 100 worms per bacterial species were used.

C. elegans strain PX627 was generated recently to allow auxin-mediated sterility induction [49] and is a very useful strain for worm aging studies. Auxin induces sterility in PX627 worms and thus avoids a mixture of generations in killing assays. Auxin-induced self-sterility is comparable to FUdR-induced sterility but is non-toxic and avoids the compound interactions with other experimental treatments. In fact, FUdR significantly increases lifespan, health parameters, and mitochondrial function, relative to auxin-treated PX627 worms and nontreated controls [50]. To isolate eggs and synchronize worm populations, gravid adults were bleached using standard laboratory procedures. The eggs were incubated on food-free NGM plates overnight at 25 °C. L1 larvae were then transferred to NGM plates containing 1 mM indole 3 acetic acid and seeded with *E. coli* OP50. Plates were incubated at 25 °C for about two days until worms reached the young adult stage. For longevity assays with *C. elegans* strain PX627, 35 mm NGM plates (five per *E. coli* strains) were inoculated with a drop of an overnight bacterial culture and incubated overnight at 30 °C. Plates were allowed to cool to room temperature before seeding with young adult hermaphrodite PX627 worms (20 per plate). The plates were then incubated at 25 °C and scored daily for live worms for about two weeks. Alternatively, a worm was considered to be dead and was removed when it no longer responded to being touched with a platinum wire. Worms that died as a result of becoming stuck to the plate wall were censored.

All longevity assays were performed at least twice.

2.4. Cell Lines, Cell Culture, and Epithelial Cell Invasion Assays

The human embryonic ileum intestine-407 (I-407) cell line (ATCC CCL6, Manassas, VA) was derived from human embryonic ileum. The cells were cultured at 37° in an atmosphere containing 5% CO₂ C in Basal Medium Eagle (ThermoFisher, Illkirch, France) supplemented with 10% (*v/v*) heat-inactivated fetal calf serum (Eurobio Scientific, France), 1% L-glutamine (ThermoFisher, Illkirch, France), 100,000 U/L penicillin, and 100 mg/L streptomycin (ThermoFisher, Illkirch, France). The cell invasion assays were based on a gentamicin protection method, as described elsewhere [7]. Briefly, 24-well plates containing 4 × 10⁵ cells/well were incubated for 20 h in the absence of antibiotics and then infected for 3 h with the *E. coli* strains, at a multiplicity of infection (MOI) of 10. The cells were washed twice with PBS, and extracellular bacteria were killed by adding fresh cell culture medium containing 100 µg/mL of gentamicin for 1 h. After three washes with PBS, the cells were lysed by adding 1 mL of 1% Triton X-100 to each well for 5 min. The number of previously intracellular bacteria was determined by plating. The invasion ratio (the number of intracellular *E. coli* divided by the total number of *E. coli* in the initial inoculum) was

multiplied by 100 and thus expressed as a percentage. An isolate was considered to be invasive when the invasion ratio was 0.1% or more. Each experiment was performed in triplicate. Non-invasive *E. coli* strains (K12 C600, MG1655, and EcN) and invasive *E. coli* strains (AIEC LF82 and AIEC NRG857c) were used respectively as negative and positive controls in each experiment. The invasion ratio data were quoted as the mean \pm standard deviation.

2.5. Microscopy

Confocal microscopy was performed using a Carl Zeiss LSM 780 microscope equipped with five lasers (405, 458, 488, 514, and 633 nm). Fluorescent labeling of lectins was done according to the general principles of lectin chemistry and bioconjugate techniques. Epithelial cells were infected according to the gentamicin procedure method with 10 bacteria per cell and incubated at 37 °C under 5% CO₂. After 3 h of incubation, host cells were washed twice with DPBS, fixed in 4% paraformaldehyde, and further stained for microscopic analysis. Host cell membranes were stained in red using fluorescent wheat germ agglutinin (WGA-Alexa 594, Vector Laboratories) at a final concentration of 5 μ g/mL whereas nuclei are stained using 1 μ M DAPI (Sigma-Aldrich). Bacteria were stained in green using a primary rabbit anti-LPS polyclonal antibody (1:5000) and a secondary rabbit anti-rabbit Alexa Fluor-488-conjugated antibody (1:5000), (ThermoFisher, Illkirch, France).

2.6. Statistical Analysis

Interstrain differences in epithelial cell invasion were probed using a non-parametric, one-way analysis of variance (the Mann–Whitney U test). Nematode survival was analyzed using the Kaplan–Maier method; differences between survival curves were assessed in a log rank (Mantel Cox) test and (for borderline results) the Gehan–Breslow–Wilcoxon test in Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Associations between variables were qualified by the *p*-value-assigned Spearman rank correlation coefficient, together with linear (Pearson) regression using the XLSTAT add-on (Addinsoft, Bordeaux, France) for Excel® (Microsoft, Inc, Redmond, WA, USA). The threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Strain-Specific *E. coli* Infection Impacts the Survival of *C. elegans*

In a first set of experiments, we evaluated *C. elegans*' lifespan upon infection with three non-invasive non-pathogenic *E. coli* strains (OP50, MG1655, and the probiotic-like EcN), and three AIEC strains (LF82, EC-06362, and NRG857c) (Figure 1). N2 worms feeding on OP50 showed the greatest longevity, with an LT₅₀ of 16 days. In contrast, *C. elegans*' LT₅₀ was shortened to 11 to 13 days by the other bacterial strains assessed. There were significant differences between OP50 on one hand and the non-invasive EcN and MG1655 strains on the other ($p < 0.01$ in a log-rank test, Figure 2A,B). Furthermore, LT₅₀ was significantly shorter for MG1655 than for EcN (Figure 2C). When considering strains with invasive properties, LT₅₀ was 11 days for LF82 and EC-6362 and 13 days for NRG857c. Whereas the *C. elegans* survival curves for the AIEC strains LF82 and EC-6362 were essentially superimposable (Figure 3A), the lifespans was significantly longer for the non-invasive MG1655 strain ($p < 0.01$ in a log-rank test, Figure 4A,B) and the AIEC NRG857c ($p < 0.01$, Figure 3A,B). Unexpectedly, *C. elegans*' lifespan was longer for the profibrogenic pathobiont NRG857c than for the non-invasive MG1655 (Figure 4C).

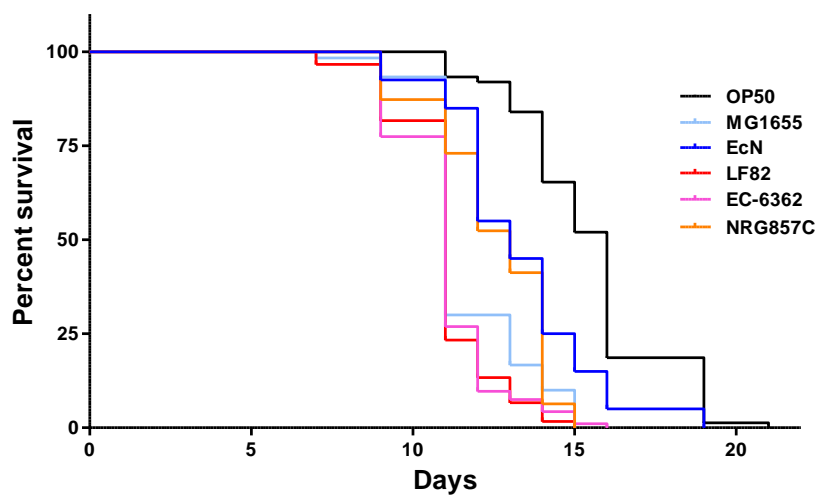


Figure 1. Kaplan–Meier survival plots of killing assays for *C. elegans* (N2) infected with six different *E. coli* strains. The “*n*” values in brackets correspond to the initial number of larvae investigated for each bacterial strain. L4 larvae were transferred to lawns of OP50 (the control strain: $n = 84$), MG1655 ($n = 74$), EcN ($n = 45$), LF82 ($n = 78$), EC-6362 ($n = 101$), and NRG857C ($n = 65$).

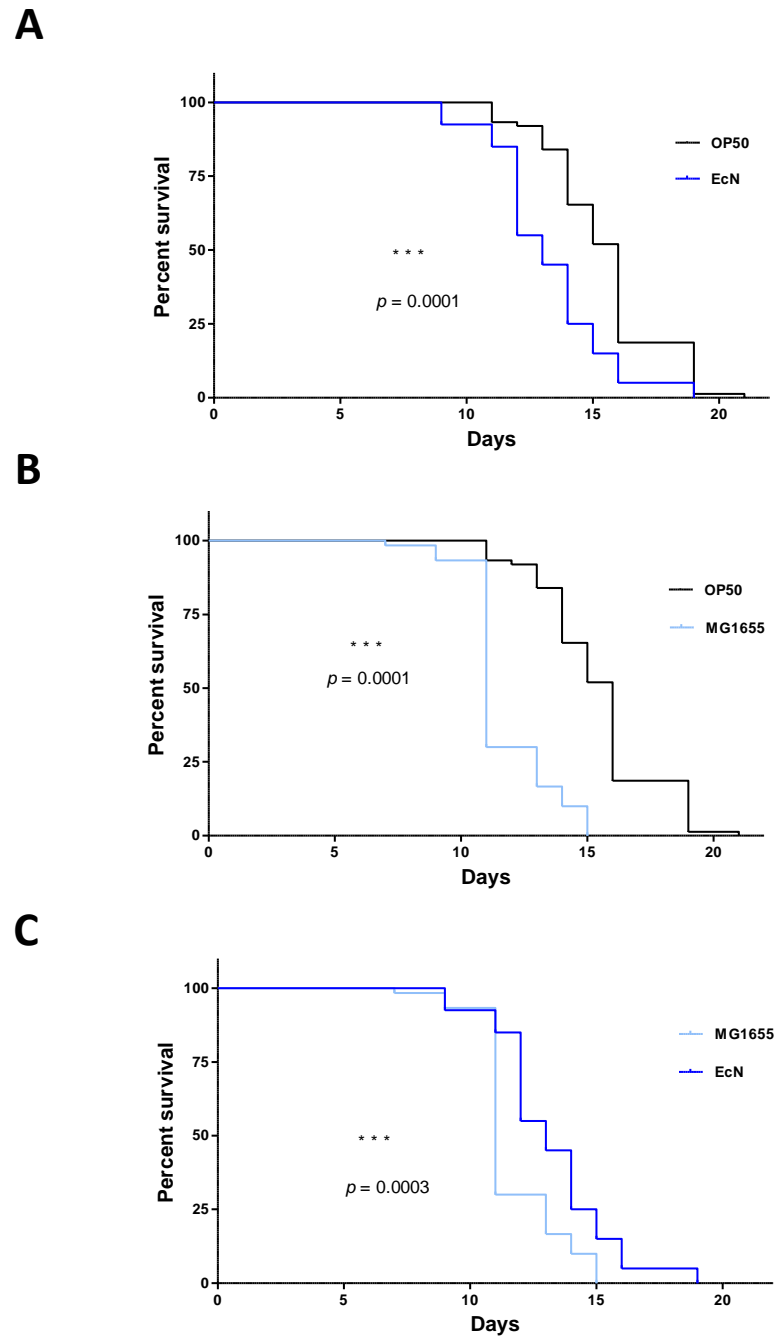


Figure 2. Pairwise comparisons of the effects of *E. coli* strains on *C. elegans*' lifespan. The “*n*” values in brackets correspond to the initial number of larvae investigated for each bacterial strain (A) OP50 (*n* = 84) vs. EcN (*n* = 45). (B) OP50 (*n* = 84) vs. MG1655 (*n* = 74). (C) MG1655 (*n* = 74) vs. EcN (*n* = 45). The statistical significance of intergroup differences was assessed with a log-rank (Mantel-Cox) test; ***. $p < 0.001$.

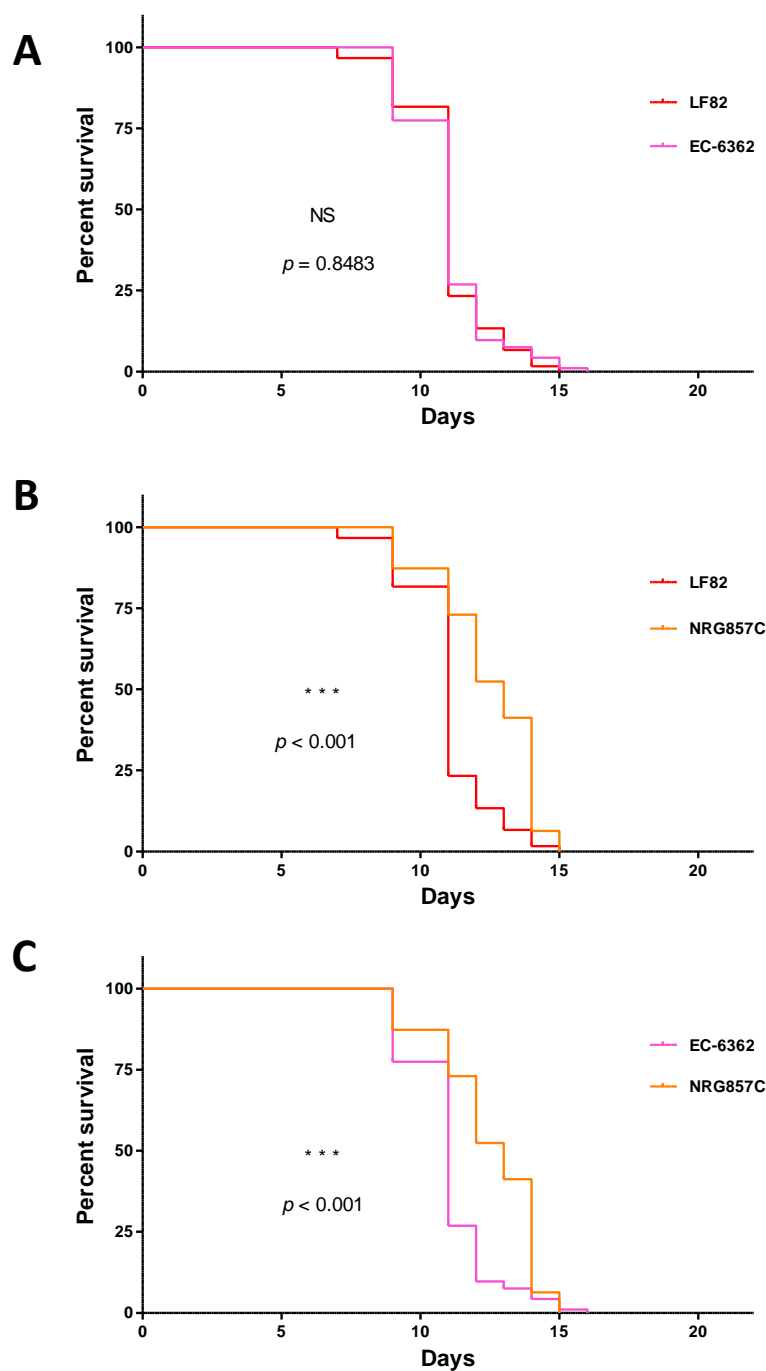


Figure 3. Pairwise comparisons of *C. elegans* lifespan-modulating effects of *E. coli* strains. The “*n*” values in brackets correspond to the initial number of larvae investigated for each bacterial strain (A) LF82 (*n* = 78) vs. EC-6362 (*n* = 101). (B) LF82 (*n* = 78) vs. NRG857c (*n* = 65). (C) EC-6362 (*n* = 101) vs. NRG857c (*n* = 65). The statistical significance of intergroup differences was assessed with a log-rank (Mantel-Cox) test; ***: $p < 0.001$; NS: not significant).

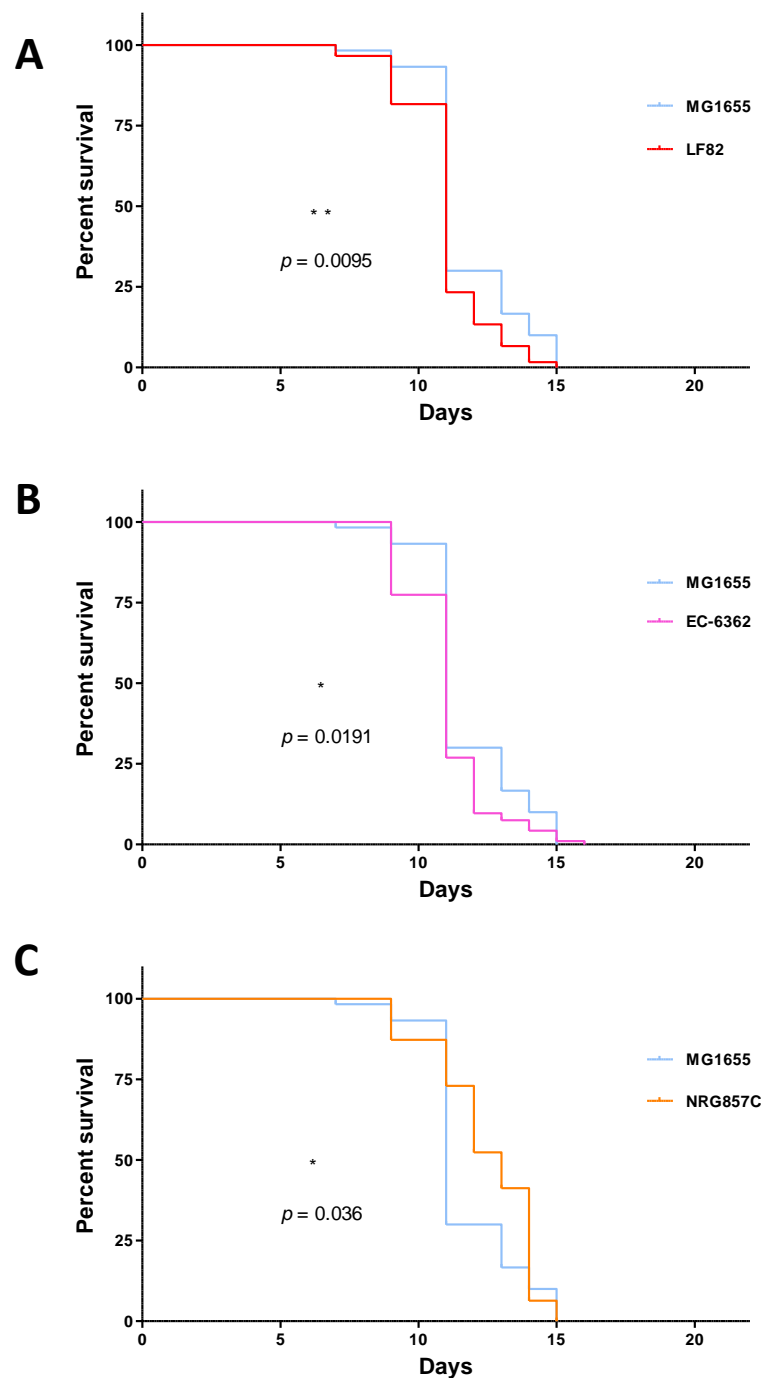


Figure 4. Pairwise comparisons of *C. elegans* lifespan-modulating effects of *E. coli* strains (A) MG1655 ($n = 74$) vs. LF82 ($n = 78$). (B) MG1655 ($n = 74$) vs. EC-6362 ($n = 101$). (C) MG1655 ($n = 74$) vs. NRG857c ($n = 65$). The “ n ” values in brackets correspond to the initial number of larvae investigated for each bacterial strain. The statistical significance of intergroup differences was assessed with a log-rank (Mantel-Cox) test; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

Of all the strains investigated here, the anti-inflammatory EcN was associated with the longest lifespan (with the exception of OP50, whose low proliferation rate in the gut maximizes *C. elegans*’ lifespan), when compared with the AIEC NRG857c ($p = 0.0327$, data not shown). Overall, the AIEC phenotype did not appear to be tightly associated with a shortening of *C. elegans*’ lifespan.

3.2. AIEC Strains Differ in Their Cell Invasion Properties In Vitro

By definition, an AIEC must have an invasion ratio of 0.1% of the initial inoculum at a MOI of 10 on I-407 epithelial cells [7]. Given this somewhat arbitrary threshold, individual strains can exhibit different levels of invasiveness and/or borderline invasiveness. These strain-specific properties were highlighted by confocal microscopy of stained intracellular *E. coli* (Figure 5). We performed invasion assays with 16 *E. coli* human isolates selected as putative AIEC, together with MG1655 and LF82 (Figure 6). The degree of invasiveness ranged from non-invasive (invasion ratio <0.1%) for MG1655, EC-7090, and 7113 to moderate (invasion ratio between 0.1 and 0.25%) for EC-6089, EC-6100, EC-6259, EC-6029, EC-7033, EC-7074, and EC-7107 and highly invasive (invasion ratio >0.25%) for LF82, EC-6362, EC-6097, EC-7101, EC-7103, and EC-713. These data confirmed that as an intrinsic phenotypic characteristic, individual AIEC strains differ in their invasiveness.

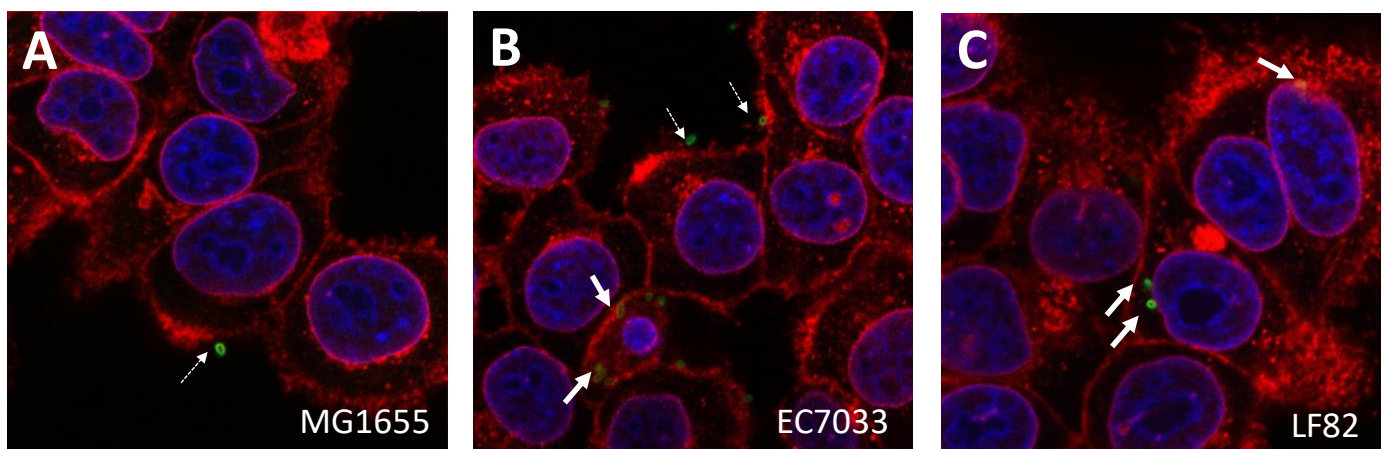


Figure 5. Confocal microscopy illustrating the rare events of cell-adhering (extracellular) and cell-invaded (intracellular) *E. coli* strains on I-407 cells after a 3 h incubation and extensive washings. (A): Non-invasive MG1655 (B): EC.7033 AIEC. (C): LF82 AIEC. Extracellular (dotted arrows) and intracellular (bold arrows) bacteria are identified by immune detection (green); Epithelial cells are contrasted by DAPI-labelled nuclei (blue) and WGA-labelled membranes (red) (see methods). Original magnification X 63.

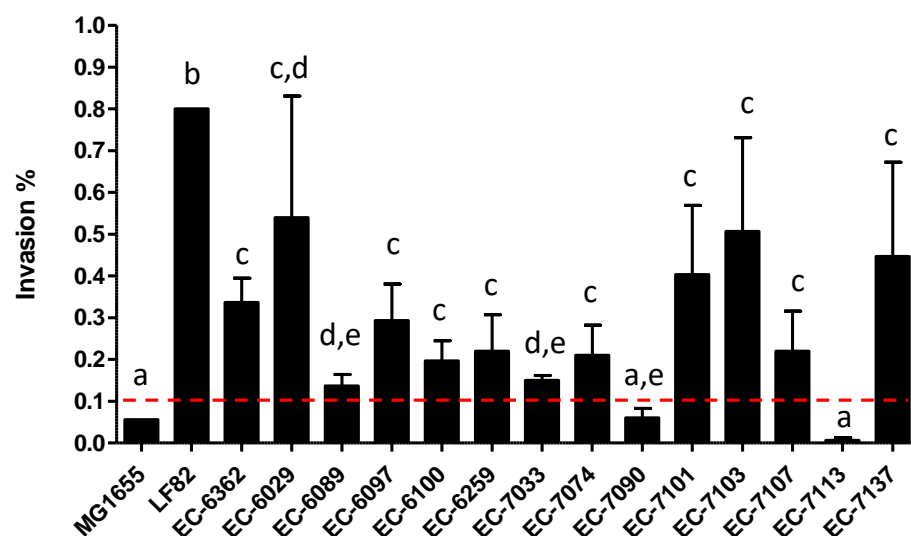


Figure 6. Strains of *E. coli* ($n = 16$) different in their ability to invade I-407 cells. The invasion ratio (the number of intracellular *E. coli* divided by the total number of *E. coli* in the initial inoculum at a

MOI of 10) after a 3 h incubation and a 1 h treatment with gentamicin was multiplied by 100 and thus expressed as a percentage. Strains with an invasion index $\geq 0.1\%$ (the threshold indicated by a dotted line) are classified as AIEC. The data are quoted as the mean \pm standard deviation from three determinations. The various letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between strains in a one-way analysis of variance (the Mann–Whitney U test).

3.3. Assessment of the AIEC's Pathogenicity in *C. elegans*

In order to mitigate possible bias due to exposure to FUdR in the longevity assay, we used the PX627 *C. elegans* strain. Auxin treatment restricted to the L1 to L4 development phase is sufficient to induce PX627 sterility (see the Methods section) and thus induces sterility. We assessed survival upon growth on three non-invasive *E. coli* strains ($n = 3$), seven moderately invasive strains, and six highly invasive strains, (Figure 7A–P). LT_{50} ranged from five days for the non-invasive EC-7113 strain to eight days for MG1655. However, the invasion ratio in an in vitro cell culture assay was not correlated with virulence in the *C. elegans* longevity assay. For instance, a moderately invasive strain (EC-7074) had a short LT_{50} (5 days), while a highly invasive strain (EC-7103) had an LT_{50} of seven days. Our data confirmed that clinical *E. coli* isolates differ in their impact on *C. elegans*' longevity. Some of the highly invasive strains lengthened the lifespan, and the correlation between the invasion ratio and LT_{50} (as assessed with Pearson's coefficient ($r^2 = 8.9 \times 10^{-6}$) and Spearman's non-parametric rank correlation coefficient ($r_s = 0.059$)) was not statistically significant (Figure 8). Hence, the AIEC's invasiveness was clearly not correlated with *C. elegans*' lifespan.

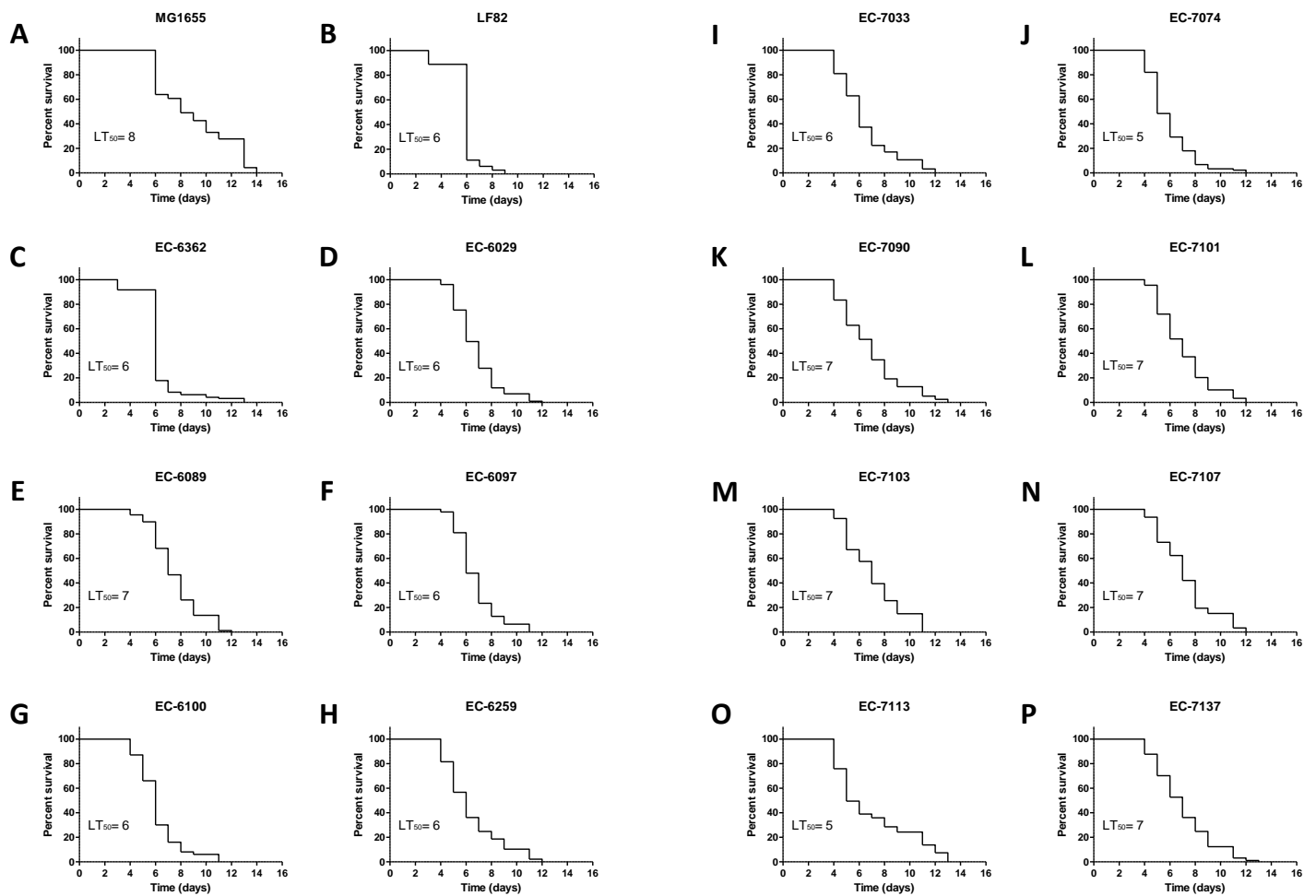


Figure 7. Kaplan–Meier survival plots from individual killing assays for *C. elegans* (PX627) infected with 16 distinct *E. coli* strains. The “*n*” values in brackets correspond to the initial number of larvae investigated for each bacterial strain. *C. elegans* young adults were transferred to lawns of (A) MG1655 (*n* = 94), (B) LF82 (*n* = 98), (C) EC-6362 (*n* = 96), (D) EC-6029 (*n* = 101), (E) EC-6089 (*n* = 88), EC-6097 (*n* = 94), (G) EC-6100 (*n* = 100), (H) EC-6259 (*n* = 97), (I) EC-7033 (*n* = 94), (J) EC-7074 (*n* = 89), (K) EC-7090 (*n* = 78), (L) EC-7101 (*n* = 89), (M) EC-7103 (*n* = 94), (N) EC-7107 (*n* = 93), (O) EC-7113 (*n* = 99), and (P) EC-7137 (*n* = 97). The median lifespan (LT_{50}) for each evaluated strain is expressed in days.

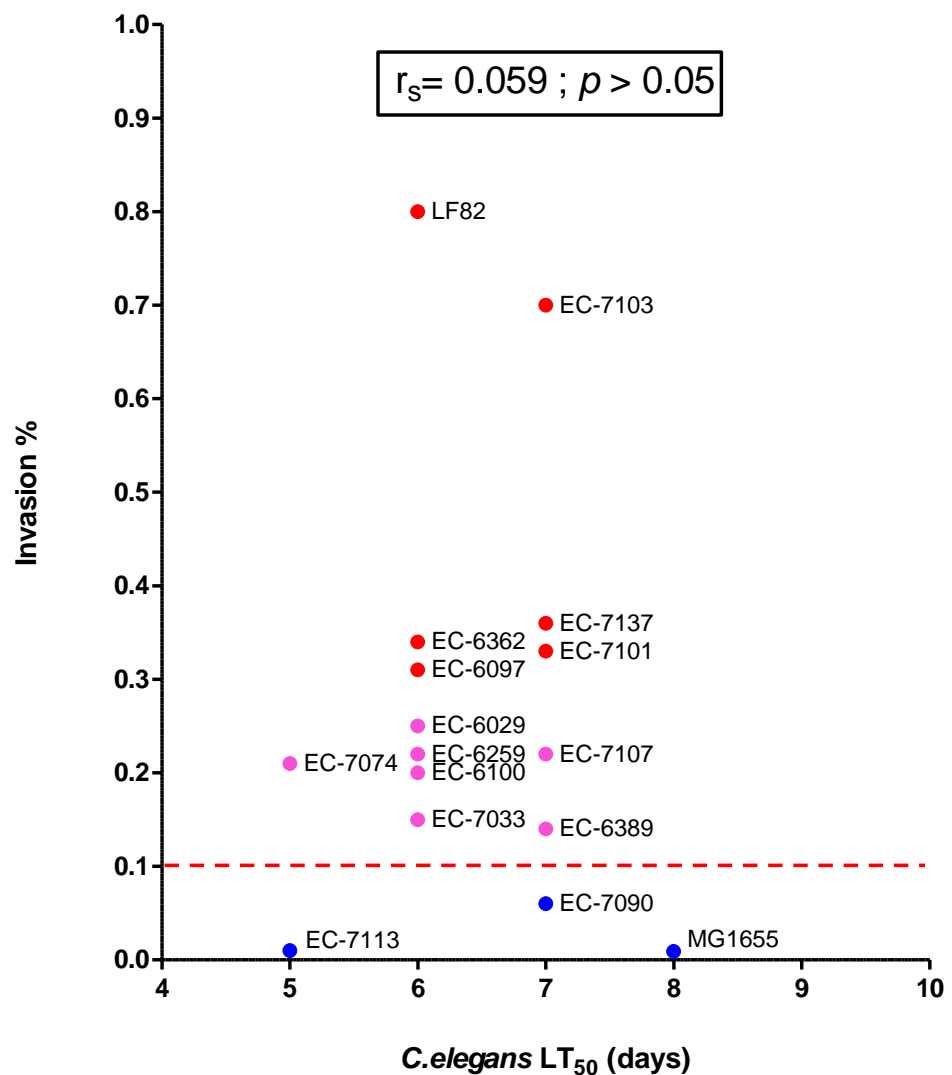


Figure 8. Lack of association between the median lifespan (LT₅₀) of *E. coli*-infected *C. elegans* and the corresponding invasion ratio with the I-407 epithelial cell line, for 16 distinct *E. coli* strains. Strains with an invasion index $\geq 0.1\%$ (the threshold indicated by a dotted line) are classified as AIEC. The correlation's statistical significance was assessed by calculating Pearson's regression coefficient and Spearman's non-parametric rank correlation r_s coefficient.

4. Discussion

Identification of the AIEC pathotype is still challenging; most of the techniques currently used to investigate host–pathobiont cross-talk are based on the infection of (immortalized) cell lines [24]. These assays are sometimes limited by the cell lines' loss of key physiological features. Hence, integrated and/or more relevant models are required. The use of human intestinal cells derived from a patient's colonic organoids has deepened our understanding of the physiopathology of IBD, inter-individual variability, and the lesions' precise location in the gut [51]. Although the organoid model offers many advantages, it is still time-consuming and costly and requires the patient's consent for access to biopsies. Preclinical animal models (e.g., such as chemically-induced inflammation in rodents [11,52,53] or susceptible transgenic mice [52]) are useful for identifying specific pathogenic effects of AIEC on the host (such as the induction of fibrogenesis [54] and autophagy [55,56]), or highlighting the role of the microenvironment [57,58] and bacterial virulence

factors [59,60]. However, these animal models are not practical for extensive screening of a large number of strains nor for extended therapeutic approaches [8].

As a simple host that multiplies quickly, *C. elegans* has emerged as a robust animal model for investigating microbial pathogenesis [61,62] and the beneficial effects of certain bacteria [30]. In the scientific literature, there are a few studies of the virulence of a small number of strains from the same bacterial species. Strain specificity has been clearly linked to levels of virulence for Gram-positive *Staphylococcus aureus* [63] and Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* [64]. Interestingly, the most pathogenic strains did not show the highest level of colonization. With regard to *E. coli*, most of the studies concerned enterohemorrhagic, enteropathogenic, and enterotoxinogenic pathovar strains that kill *C. elegans* in a few hours [35]. In contrast, commensal bacteria (including pathobionts lacking known invasive determinant genes) have been rarely studied. Simonson et al. [39] showed that live LF82 AIEC (but not heat-killed counterparts) drastically shortened *C. elegans*' lifespan, relative to the OP50 strain. Moreover, several LF82 mutants were found to be attenuated in the killing assay, which suggested that several *E. coli* genes were associated with loss of tolerance and mortality [39]. In a study of the MG1655 K-12 strain (lacking the O antigen), recombinant derivatives producing various O antigens were considerably more virulent in the lifespan assay [65]. Furthermore, the commensal *E. coli* HS strain [66] killed *C. elegans* as efficiently as an enteroaggregative strain or the O antigen producing strains. The results suggest that neither commensal *versus* pathogenic status nor a strain's origin accurately predicts the effect on *C. elegans* lifespan. Accordingly, the results of infection assays with various well-characterized extended-spectrum- β -lactamase-producing *E. coli* and β -lactam-susceptible *E. coli* isolates indicated that the ability to kill *C. elegans* was correlated with the presence of virulence factors, and that CTX-M-producing isolates had a relatively low impact on the nematode [67]. Schifano et al.'s study of UPEC from different phylogroups showed that the ability to adhere to and invade epithelial cells was not correlated with shorter lifespan nor with gut colonization in the nematode model, although pathogenicity was more closely related to the level of oxidative stress [37]. Our present results are in line with the literature data, since AIEC strains are similar to extra-intestinal pathogenic *E. coli* strains and UPEC strains with regard to their ability to adhere and invade host cells [38,68].

Overall, the worm's responses to bacterial infections might partly be influenced by (i) the *C. elegans* strain used and (ii) the method to induce sterility and prevent progeny arising during the assay. For example, the OP50-mediated LT_{50} was determined to be 6 days or 10 days in two studies using the Bristol N2 strain on FUDR plates or daily transfer onto new plates, respectively [65,69]. However, the OP50-mediated LT_{50} was 12 to 14 days in experiments with the SS104 temperature-sensitive (25 °C) *C. elegans* mutant [39]. Here, we confirmed that the lifespan of PX627 worms was shorter with the LF82 AIEC prototype than with OP50 [39]. Use of the PX627 *C. elegans* strain enabled us to avoid sterilizing treatment with FUDR—a compound that might affect the worm and the bacterium. Indeed, FUDR has antineoplastic properties and might inhibit cell invasion by AIEC, as has been demonstrated for the analogous drug 6-mercaptopurine [70].

As mentioned above, the adhesion and invasiveness of the AIEC strains are assessed with human epithelial cells. However, these properties are cell-line dependent. Variations in the invasion ratio and survival inside macrophages have also been reported [12,26]. Furthermore, a given strain's invasiveness is also influenced by environmental parameters such as the culture medium [71], bacterial catabolites [72], bacterial metabolites (e.g., propionate and short chain fatty acids [73,74]), other host-derived molecules (e.g., lactoferrin [75]), and emulsifiers present in food [58,76]. Taken as a whole, variable and potentially unknown determinants of AIEC status and virulence might account for the inconsistent nature of the AIEC's interaction with cell lines and the lack of correlation with *C. elegans*' lifespan. Another limitation is linked to the incubation temperature for the *C. elegans* invertebrate model (25 °C), which differs markedly from the host (human) body temperature.

In conclusion, the intrinsic invasiveness of AIEC with intestinal epithelial cell line (i.e., the fact for an individual strain to be characterized as invasive or not together with the intensity of invasion, established in % from the infectious inoculum), was not correlated with *C. elegans*' lifespan. Provided that the worm's lifespan is low when incubated with certain AIEC strains (such as LF82), this model could nevertheless be used to screen drugs or anti-invasive probiotic-like strains for their ability to increase/restore longevity in *C. elegans*. This strategy could be used to target specific AIEC clones via competition [69,77,78,79] or via more general anti-inflammatory and anti-oxidant properties [80]. Indeed, inoculation with certain probiotic bacteria (including strains of *Propionibacterium freundenreichii*, bifidobacteria spp., and many lactobacilli spp.) is associated with greater *C. elegans* survival in a strain-specific manner [30,81,82]. Interestingly, bacteria with intrinsic anti-inflammatory and anti-oxidant properties extended the lifespan of *C. elegans* and were also able to alleviate colitis in mice [83].

Author Contributions: Conceptualization, B.F., M.T., and E.P.; methodology, B.F., M.T., E.P., M.B.d.S.F. and F.G.; validation, B.F., M.T., and E.P.; formal analysis, B.F., M.T., M.B.d.S.F., and E.P.; investigation, M.T., E.P., F.G., S.M., M.P., M.B.d.S.F. and I.H.; resources, C.N., E.P., C.F., and A.B.; data curation, M.T., B.F., and E.P.; writing—original draft preparation, M.T., B.F., and M.B.d.S.F.; writing—review and editing, E.P., B.F., M.T., A.B., C.D., and D.A.; supervision, B.F. and M.T.; project administration, B.F. and M.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project: namely SALMA–AIEC, was co-funded by the European Union's European Regional Development Fund (ERDF), the Hauts de France Regional Council (grant reference: 18006176), Métropole Européenne de Lille (grant reference: 2016_ESR_05), and the French government (grant reference: 2018-3-CTRL_IPL_Phase2).

Institutional Review Board Statement: Not relevant for this study

Informed Consent Statement: "Informed consent was obtained from all subjects involved in the study."

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We are grateful to Jonathan Ewbank for the kind gift of the PX627 *C. elegans* strain, the DigestScience Foundation (Lille, France) for supporting our laboratory's research activities, and Alain Meybeck for logistical assistance. We also warmly thank Bernadette Leu for administrative management.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Furey, T.S.; Sethupathy, P.; Sheikh, S.Z. Redefining the IBDs Using Genome-Scale Molecular Phenotyping. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16*, 296–311, doi:10.1038/s41575-019-0118-x.
2. Annese, V. Genetics and Epigenetics of IBD. *Pharm. Res.* **2020**, *159*, 104892, doi:10.1016/j.phrs.2020.104892.
3. Pascal, V.; Pozuelo, M.; Borruel, N.; Casellas, F.; Campos, D.; Santiago, A.; Martinez, X.; Varela, E.; Sarrabayrouse, G.; Machiels, K.; et al. A Microbial Signature for Crohn's Disease. *Gut* **2017**, *66*, 813–822, doi:10.1136/gutjnl-2016-313235.
4. Round, J.L.; Mazmanian, S.K. The Gut Microbiota Shapes Intestinal Immune Responses during Health and Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 313–323, doi:10.1038/nri2515.
5. Tamboli, C.P.; Neut, C.; Desreumaux, P.; Colombel, J.F. Dysbiosis in Inflammatory Bowel Disease. *Gut* **2004**, *53*, 1–4, doi:10.1136/gut.53.1.1.
6. 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.
7. 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, doi:10.1128/IAI.67.9.4499-4509.1999.
8. 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, doi:10.1136/gutjnl-2017-314903.

9. 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, doi:10.1002/ibd.20860.
10. Simpson, K.W.; Dogan, B.; Rishniw, M.; Goldstein, R.E.; Klaessig, S.; McDonough, P.L.; German, A.J.; Yates, R.M.; Russell, D.G.; Johnson, S.E.; et al. Adherent and Invasive *Escherichia coli* Is Associated with Granulomatous Colitis in Boxer Dogs. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 4778–4792, doi:10.1128/IAI.00067-06.
11. 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.
12. Ohno, M.; Hasegawa, M.; Hayashi, A.; Caballero-Flores, G.; Alteri, C.J.; Lawley, T.D.; Kamada, N.; Núñez, G.; Inohara, N. Lipopolysaccharide O Structure of Adherent and Invasive *Escherichia coli* Regulates Intestinal Inflammation via Complement C3. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, e1008928, doi:10.1371/journal.ppat.1008928.
13. Nadalian, B.; Yadegar, A.; Houri, H.; Olfatifar, M.; Shahrokh, S.; Asadzadeh Aghdaei, H.; Suzuki, H.; Zali, M.R. Prevalence of the Pathobiont Adherent-Invasive *Escherichia coli* and Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *36*, 852–863, doi:10.1111/jgh.15260.
14. Desilets, M.; Deng, X.; Deng, X.; Rao, C.; Ensminger, A.W.; Krause, D.O.; Sherman, P.M.; Gray-Owen, S.D. Genome-Based Definition of an Inflammatory Bowel Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Pathovar. *Inflamm. Bowel. Dis.* **2016**, *22*, 1992–1998, doi:10.1097/MIB.0000000000000574.
15. Prorok-Hamon, M.; Friswell, M.K.; Alswied, A.; Roberts, C.L.; Song, F.; Flanagan, P.K.; Knight, P.; Codling, C.; Marchesi, J.R.; Winstanley, C.; et al. Colonic Mucosa-Associated Diffusely Adherent AfaC+ *Escherichia coli* Expressing LpfA and Pks Are Increased in Inflammatory Bowel Disease and Colon Cancer. *Gut* **2014**, *63*, 761–770, doi:10.1136/gutjnl-2013-304739.
16. Long, A.G.; Lundsmith, E.T.; Hamilton, K.E. Inflammation and Colorectal Cancer. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* **2017**, *13*, 341–351, doi:10.1007/s11888-017-0373-6.
17. Rahmouni, O.; Vignal, C.; Titécát, M.; Folligné, B.; Pariente, B.; Dubuquoy, L.; Desreumaux, P.; Neut, C. High Carriage of Adherent Invasive *E. coli* in Wildlife and Healthy Individuals. *Gut Pathog.* **2018**, *10*, 23, doi:10.1186/s13099-018-0248-7.
18. Astley, D.J.; Masters, N.; Kuballa, A.; Katouli, M. Commonality of Adherent-Invasive *Escherichia coli* Isolated from Patients with Extraintestinal Infections, Healthy Individuals and the Environment. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2021**, *40*, 181–192, doi:10.1007/s10096-020-04066-5.
19. DeJong, E.N.; Surette, M.G.; Bowdish, D.M.E. The Gut Microbiota and Unhealthy Aging: Disentangling Cause from Consequence. *Cell Host Microbe* **2020**, *28*, 180–189, doi:10.1016/j.chom.2020.07.013.
20. Kotlowski, R.; Bernstein, C.N.; Sepehri, S.; Krause, D.O. 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.
21. Mirsepassi-Lauridsen, H.C.; Vallance, B.A.; Krogfelt, K.A.; Petersen, A.M. *Escherichia coli* Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *32*, doi:10.1128/CMR.00060-18.
22. Shaler, C.R.; Elhenawy, W.; Coombes, B.K. The Unique Lifestyle of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431*, 2970–2981, doi:10.1016/j.jmb.2019.04.023.
23. Shawki, A.; McCole, D.F. Mechanisms of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *3*, 41–50, doi:10.1016/j.jcmgh.2016.10.004.
24. 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*, 2695, doi:10.1038/s41598-018-20843-x.
25. Camprubí-Font, C.; Ewers, C.; Lopez-Siles, M.; Martinez-Medina, M. Genetic and Phenotypic Features to Screen for Putative Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 108, doi:10.3389/fmicb.2019.00108.
26. Tawfik, A.; Knight, P.; Duckworth, C.A.; Pritchard, D.M.; Rhodes, J.M.; Campbell, B.J. Replication of Crohn's Disease Mucosal *E. coli* Isolates inside Macrophages Correlates with Resistance to Superoxide and Is Dependent on Macrophage NF-Kappa B Activation. *Pathogens* **2019**, *8*, 74, doi:10.3390/pathogens8020074.
27. Martin, H.M.; Campbell, B.J.; Hart, C.A.; Mpofu, C.; Nayar, M.; Singh, R.; Englyst, H.; Williams, H.F.; Rhodes, J.M. 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.
28. Gerbaba, T.K.; Green-Harrison, L.; Buret, A.G. Modeling Host-Microbiome Interactions in *Caenorhabditis elegans*. *J. Nematol.* **2017**, *49*, 348–356.
29. Ermolaeva, M.A.; Schumacher, B. Insights from the Worm: The *C. elegans* Model for Innate Immunity. *Semin. Immunol.* **2014**, *26*, 303–309, doi:10.1016/j.smim.2014.04.005.
30. Poupet, C.; Chassard, C.; Nivoliez, A.; Bornes, S. *Caenorhabditis elegans*, a Host to Investigate the Probiotic Properties of Beneficial Microorganisms. *Front. Nutr.* **2020**, *7*, 135, doi:10.3389/fnut.2020.00135.
31. Aballay, A.; Yorgey, P.; Ausubel, F.M. *Salmonella* Typhimurium Proliferates and Establishes a Persistent Infection in the Intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **2000**, *10*, 1539–1542, doi:10.1016/s0960-9822(00)00830-7.
32. Labrousse, A.; Chauvet, S.; Couillaud, C.; Kurz, C.L.; Ewbank, J.J. *Caenorhabditis elegans* Is a Model Host for *Salmonella* Typhimurium. *Curr. Biol.* **2000**, *10*, 1543–1545, doi:10.1016/s0960-9822(00)00833-2.

33. Lee, J.; Choe, J.; Kim, J.; Oh, S.; Park, S.; Kim, S.; Kim, Y. Heat-Killed *Lactobacillus* Spp. Cells Enhance Survivals of *Caenorhabditis elegans* against *Salmonella* and *Yersinia* Infections. *Lett. Appl. Microbiol.* **2015**, *61*, 523–530, doi:10.1111/lam.12478.
34. Mellies, J.L.; Barron, A.M.S.; Haack, K.R.; Korson, A.S.; Oldridge, D.A. The Global Regulator *Ler* Is Necessary for Enteropathogenic *Escherichia coli* Colonization of *Caenorhabditis elegans*. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 64–72, doi:10.1128/IAI.74.1.64-72.2006.
35. Anyanful, A.; Dolan-Livengood, J.M.; Lewis, T.; Sheth, S.; DeZalia, M.N.; Sherman, M.A.; Kalman, L.V.; Benian, G.M.; Kalman, D. Paralysis and Killing of *Caenorhabditis elegans* by Enteropathogenic *Escherichia coli* Requires the Bacterial Tryptophanase Gene. *Mol. Microbiol.* **2005**, *57*, 988–1007, doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04739.x.
36. Chou, T.-C.; Chiu, H.-C.; Kuo, C.-J.; Wu, C.-M.; Syu, W.-J.; Chiu, W.-T.; Chen, C.-S. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like Toxin 1 Is Required for Full Pathogenicity and Activation of the P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Cell. Microbiol.* **2013**, *15*, 82–97, doi:10.1111/cmi.12030.
37. Schifano, E.; Marazzato, M.; Ammendolia, M.G.; Zanni, E.; Ricci, M.; Comanducci, A.; Goldoni, P.; Conte, M.P.; Uccelletti, D.; Longhi, C. Virulence Behavior of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains in the Host Model *Caenorhabditis elegans*. *Microbiology-open* **2019**, *8*, e00756, doi:10.1002/mbo3.756.
38. Conte, M.P.; Aleandri, M.; Marazzato, M.; Conte, A.L.; Ambrosi, C.; Nicoletti, M.; Zagaglia, C.; Gambarà, G.; Palombi, F.; De Cesaris, P.; et al. The Adherent/Invasive *Escherichia coli* Strain LF82 Invades and Persists in Human Prostate Cell Line RWPE-1, Activating a Strong Inflammatory Response. *Infect. Immun.* **2016**, *84*, 3105–3113, doi:10.1128/IAI.00438-16.
39. Simonsen, K.T.; Nielsen, G.; Bjerrum, J.V.; Kruse, T.; Kallipolitis, B.H.; Møller-Jensen, J. A Role for the RNA Chaperone Hfq in Controlling Adherent-Invasive *Escherichia coli* Colonization and Virulence. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e16387, doi:10.1371/journal.pone.0016387.
40. Brenner, S. The genetics Of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **1974**, *77*, 71.
41. Samuel, B.S.; Rowedder, H.; Braendle, C.; Félix, M.-A.; Ruvkun, G. *Caenorhabditis elegans* Responses to Bacteria from Its Natural Habitats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E3941–E3949, doi:10.1073/pnas.1607183113.
42. Blattner, F.R.; Plunkett, G.; Bloch, C.A.; Perna, N.T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J.D.; Rode, C.K.; Mayhew, G.F.; et al. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **1997**, *277*, 1453–1462, doi:10.1126/science.277.5331.1453.
43. Wassenaar, T.M. Insights from 100 Years of Research with Probiotic *E. coli*. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* **2016**, *6*, 147–161, doi:10.1556/1886.2016.00029.
44. Sonnenborn, U. *Escherichia coli* Strain Nissle 1917—from Bench to Bedside and Back: History of a Special *Escherichia coli* Strain with Probiotic Properties. *FEMS Microbiol. Lett.* **2016**, *363*, doi:10.1093/femsle/fnw212.
45. 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, doi:10.1038/ncomms2957.
46. Nash, J.H.; Villegas, A.; Kropinski, A.M.; Aguilar-Valenzuela, R.; Konczyk, P.; Mascarenhas, M.; Ziebell, K.; Torres, A.G.; Karmali, M.A.; Coombes, B.K. Genome Sequence of Adherent-Invasive *Escherichia coli* and Comparative Genomic Analysis with Other *E. coli* Pathotypes. *BMC Genom.* **2010**, *11*, 667, doi:10.1186/1471-2164-11-667.
47. Dreux, N.; Denizot, J.; Martínez-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, doi:10.1371/journal.ppat.1003141.
48. De Sordi, L.; Khanna, V.; Debarbieux, L. The Gut Microbiota Facilitates Drifts in the Genetic Diversity and Infectivity of Bacterial Viruses. *Cell Host Microbe* **2017**, *22*, 801–808.e3, doi:10.1016/j.chom.2017.10.010.
49. Kasimatis, K.R.; Moerdyk-Schauwecker, M.J.; Phillips, P.C. Auxin-Mediated Sterility Induction System for Longevity and Mating Studies in *Caenorhabditis elegans*. *G3 Genes Genomes Genet.* **2018**, *8*, 2655–2662, doi:10.1534/g3.118.200278.
50. Dilberger, B.; Baumanns, S.; Spieth, S.T.; Wenzel, U.; Eckert, G.P. Infertility Induced by Auxin in PX627 *Caenorhabditis elegans* Does Not Affect Mitochondrial Functions and Aging Parameters. *Aging* **2020**, *12*, 12268–12284, doi:10.18632/aging.103413.
51. Mayorgas, A.; Dotti, I.; Martínez-Picola, M.; Esteller, M.; Bonet-Rossinyol, Q.; Ricart, E.; Salas, A.; Martínez-Medina, M. A Novel Strategy to Study the Invasive Capability of Adherent-Invasive *Escherichia coli* by Using Human Primary Organoid-Derived Epithelial Monolayers. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 646906, doi:10.3389/fimmu.2021.646906.
52. 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, doi:10.1002/ibd.20423.
53. Chokr, D.; Cornu, M.; Neut, C.; Bortolus, C.; Charlet, R.; Desreumaux, P.; Specia, S.; Sendid, B. Adherent Invasive *Escherichia coli* (AIEC) Strain LF82, but Not *Candida albicans*, Plays a Profibrogenic Role in the Intestine. *Gut Pathog.* **2021**, *13*, 5, doi:10.1186/s13099-021-00401-z.
54. 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*, e1005907, doi:10.1371/journal.ppat.1005907.
55. 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, doi:10.1053/j.gastro.2013.10.021.

56. 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*, doi:10.3390/cells8010035.
57. Elhenawy, W.; Hordienko, S.; Gould, S.; Oberc, A.M.; Tsai, C.N.; Hubbard, T.P.; Waldor, M.K.; Coombes, B.K. High-Throughput Fitness Screening and Transcriptomics Identify a Role for a Type IV Secretion System in the Pathogenesis of Crohn's Disease-Associated *Escherichia coli*. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 2032, doi:10.1038/s41467-021-22306-w.
58. Viennois, E.; Bretin, A.; Dubé, P.E.; Maue, A.C.; Dauriat, C.J.G.; Barnich, N.; Gewirtz, A.T.; Chassaing, B. Dietary Emulsifiers Directly Impact Adherent-Invasive *E.coli* Gene Expression to Drive Chronic Intestinal Inflammation. *Cell Rep.* **2020**, *33*, 108229, doi:10.1016/j.celrep.2020.108229.
59. 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, doi:10.1097/MIB.0000000000000609.
60. Gibold, L.; Garenaux, E.; Dalmasso, G.; Gallucci, C.; Cia, D.; Mottet-Auselo, B.; Faïs, T.; Darfeuille-Michaud, A.; Nguyen, H.T.T.; Barnich, N.; et al. The Vat-AIEC Protease Promotes Crossing of the Intestinal Mucus Layer by Crohn's Disease-Associated *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* **2016**, *18*, 617–631, doi:10.1111/cmi.12539.
61. Sánchez-Diener, I.; Zamorano, L.; López-Causapé, C.; Cabot, G.; Mulet, X.; Peña, C.; Del Campo, R.; Cantón, R.; Doménech-Sánchez, A.; Martínez-Martínez, L.; et al. Interplay among Resistance Profiles, High-Risk Clones, and Virulence in the *Caenorhabditis elegans* *Pseudomonas aeruginosa* Infection Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, doi:10.1128/AAC.01586-17.
62. Sifri, C.D.; Begun, J.; Ausubel, F.M. The Worm Has Turned—Microbial Virulence Modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Microbiol.* **2005**, *13*, 119–127, doi:10.1016/j.tim.2005.01.003.
63. Sotto, A.; Lina, G.; Richard, J.-L.; Combescure, C.; Bourg, G.; Vidal, L.; Jourdan, N.; Etienne, J.; Lavigne, J.-P. Virulence Potential of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Diabetic Foot Ulcers: A New Paradigm. *Diabetes Care* **2008**, *31*, 2318–2324, doi:10.2337/dc08-1010.
64. Scott, E.; Holden-Dye, L.; O'Connor, V.; Wand, M.E. Intra Strain Variation of the Effects of Gram-Negative ESKAPE Pathogens on Intestinal Colonization, Host Viability, and Host Response in the Model Organism *Caenorhabditis elegans*. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 3113, doi:10.3389/fmicb.2019.03113.
65. Browning, D.F.; Wells, T.J.; França, F.L.S.; Morris, F.C.; Sevastyanovich, Y.R.; Bryant, J.A.; Johnson, M.D.; Lund, P.A.; Cunningham, A.F.; Hobman, J.L.; et al. Laboratory Adapted *Escherichia coli* K-12 Becomes a Pathogen of *Caenorhabditis elegans* upon Restoration of O Antigen Biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **2013**, *87*, 939–950, doi:10.1111/mmi.12144.
66. Rasko, D.A.; Rosovitz, M.J.; Myers, G.S.A.; Mongodin, E.F.; Fricke, W.F.; Gajer, P.; Crabtree, J.; Sebaihia, M.; Thomson, N.R.; Chaudhuri, R.; et al. The Pangenome Structure of *Escherichia coli*: Comparative Genomic Analysis of *E. coli* Commensal and Pathogenic Isolates. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 6881–6893, doi:10.1128/JB.00619-08.
67. Lavigne, J.-P.; Blanc-Potard, A.-B.; Bourg, G.; Moreau, J.; Chanal, C.; Bouziges, N.; O'callaghan, D.; Sotto, A. Virulence Genotype and Nematode-Killing Properties of Extra-Intestinal *Escherichia coli* Producing CTX-M Beta-Lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.* **2006**, *12*, 1199–1206, doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01536.x.
68. Antão, E.-M.; Wieler, L.H.; Ewers, C. Adhesive Threads of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog.* **2009**, *1*, 22, doi:10.1186/1757-4749-1-22.
69. Kim, J.; Moon, Y. Worm-Based Alternate Assessment of Probiotic Intervention against Gut Barrier Infection. *Nutrients* **2019**, *11*, 2146, doi:10.3390/nu11092146.
70. Migliore, F.; Macchi, R.; Landini, P.; Paroni, M. Phagocytosis and Epithelial Cell Invasion by Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Are Inhibited by the Anti-Inflammatory Drug 6-Mercaptopurine. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 964, doi:10.3389/fmicb.2018.00964.
71. Aygun, H.; Karamese, M.; Ozic, C.; Uyar, F. The Effects of Mucosal Media on Some Pathogenic Traits of Crohn's Disease-Associated *Escherichia coli* LF82. *Future Microbiol.* **2018**, *13*, 141–149, doi:10.2217/fmb-2017-0133.
72. Agus, A.; Richard, D.; Faïs, T.; Vazeille, E.; Chervy, M.; Bonnin, V.; Dalmasso, G.; Denizot, J.; Billard, E.; Bonnet, R.; et al. Propionate Catabolism by CD-Associated Adherent-Invasive *E. coli* Counteracts Its Anti-Inflammatory Effect. *Gut Microbes* **2021**, *13*, 1–18, doi:10.1080/19490976.2020.1839318.
73. Zhang, S.; Dogan, B.; Guo, C.; Herlekar, D.; Stewart, K.; Scherl, E.J.; Simpson, K.W. Short Chain Fatty Acids Modulate the Growth and Virulence of Pathosymbiont *Escherichia coli* and Host Response. *Antibiotics* **2020**, *9*, 462, doi:10.3390/antibiotics9080462.
74. 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, doi:10.1016/j.celrep.2020.01.078.
75. Lepanto, M.S.; Rosa, L.; Cutone, A.; Scotti, M.J.; Conte, A.L.; Marazzato, M.; Zagaglia, C.; Longhi, C.; Berlutti, F.; Musci, G.; et al. Bovine Lactoferrin Pre-Treatment Induces Intracellular Killing of AIEC LF82 and Reduces Bacteria-Induced DNA Damage in Differentiated Human Enterocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5666, doi:10.3390/ijms20225666.
76. 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*, e52132, doi:10.1371/journal.pone.0052132.
77. Anyanful, A.; Easley, K.A.; Benian, G.M.; Kalman, D. Conditioning Protects *C. elegans* from Lethal Effects of Enteropathogenic *E. coli* by Activating Genes That Regulate Lifespan and Innate Immunity. *Cell Host Microbe* **2009**, *5*, 450–462, doi:10.1016/j.chom.2009.04.012.

78. JebaMercy, G.; Balamurugan, K. Effects of Sequential Infections of *Caenorhabditis elegans* with *Staphylococcus aureus* and *Proteus mirabilis*. *Microbiol. Immunol.* **2012**, *56*, 825–835, doi:10.1111/j.1348-0421.2012.00509.x.
79. Ikeda, T.; Yasui, C.; Hoshino, K.; Arikawa, K.; Nishikawa, Y. Influence of Lactic Acid Bacteria on Longevity of *Caenorhabditis elegans* and Host Defense against *Salmonella Enterica* Serovar Enteritidis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 6404–6409, doi:10.1128/AEM.00704-07.
80. Martorell, P.; Alvarez, B.; Llopis, S.; Navarro, V.; Ortiz, P.; Gonzalez, N.; Balaguer, F.; Rojas, A.; Chenoll, E.; Ramón, D.; et al. Heat-Treated *Bifidobacterium longum* CECT-7347: A Whole-Cell Postbiotic with Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Gut-Barrier Protection Properties. *Antioxidants* **2021**, *10*, 536, doi:10.3390/antiox10040536.
81. Kwon, G.; Lee, J.; Lim, Y.-H. Dairy *Propionibacterium* Extends the Mean Lifespan of *Caenorhabditis elegans* via Activation of the Innate Immune System. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31713, doi:10.1038/srep31713.
82. Sharma, K.; Pooranachithra, M.; Balamurugan, K.; Goel, G. Probiotic Mediated Colonization Resistance against *E. coli* Infection in Experimentally Challenged *Caenorhabditis elegans*. *Microb. Pathog.* **2019**, *127*, 39–47, doi:10.1016/j.micpath.2018.11.041.
83. Grompone, G.; Martorell, P.; Llopis, S.; González, N.; Genovés, S.; Mulet, A.P.; Fernández-Calero, T.; Tiscornia, I.; Bollati-Fogolin, M.; Chambaud, I.; et al. Anti-Inflammatory *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 Strain Protects against Oxidative Stress and Increases Lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e52493, doi:10.1371/journal.pone.0052493.